

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«ХАРЬКОВСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

ГЛАВА 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МИКРООРГАНИЗМАХ

Управлять микробиологическими процессами, используемыми в производстве пищевых продуктов, усиливать и интенсифицировать полезную деятельность микроорганизмов и ликвидировать их вредные воздействия невозможно без знания основ микробиологии.

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – часть общей науки биологии; она изучает внешнюю форму, внутреннее строение, закономерности роста и развития, жизнедеятельность микроорганизмов. Микроорганизмами принято называть мельчайшие живые существа, размеры которых меньше разрешающей способности человеческого глаза (0,2 мм) или немногим превышают ее.

1.1. Положение микроорганизмов в системе живого мира.

Особенности микроорганизмов

Еще на ранних этапах развития биологии мир живых организмов ученые делили на два царства: царство растений и царство животных. С открытием микроорганизмов делались попытки распределить их между этими царствами. Однако постепенное накопление знаний о микроорганизмах, их чрезвычайное разнообразие сделало затруднительным отнесение некоторых видов к определенному царству. Оказалось, что клетки одних микробов по своей структуре напоминают клетки животных, у других – они сходны с растительными, третьи – могут сочетать признаки тех и других или существенно отличаться от них.

В 1866 г. немецкий биолог Э. Геккель предложил выделить мик-

М.Г. Зинченко

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПИЩЕВОЙ И БРОДИЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Рекомендовано Министерством образования и науки Украины
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
в том числе иностранных студентов

Харьков НТУ «ХПИ» 2008

ББК 36-1 я 7
З-63
УДК 663.11: 579.

Рецензенты: *Зайцев А.И.*, д-р фарм. наук, проф., НФУ (Харьков)
Богомолов А.В., д-р техн. наук, проф., НТУСХ (Харьков)
Клецев Н.Ф., д-р техн. наук, проф., НТУ«ХПИ» (Харьков)

Гриф присвоен Министерством образования и науки Украины, письмо № 1.4/18 – Г – 1229 от 20.07.07.

Наведені характеристики мікроорганізмів, що беруть участь у процесах перетворення сировини в харчові продукти; розглянуті основні біохімічні процеси харчових виробництв, питання інженерної реалізації процесів біосинтезу.

Призначено для студентів спеціальності "Обладнання переробних і харчових виробництв" усіх форм навчання та іноземних студентів.

Зинченко М.Г.

З-63 Биохимические и микробиологические основы пищевой и бро-
дильной технологии : учеб. пособие / Зинченко М.Г. – Х.: НТУ
«ХПИ», 2008. – на русск. яз. – 204 с.
ISBN

Приведены характеристики микроорганизмов, участвующих в процес-
сах превращения сырья в пищевые продукты; рассмотрены основные биохими-
ческие процессы пищевых производств, вопросы инженерной реализации про-
цессов биосинтеза.

Предназначено для студентов специальности «Оборудование перераба-
тывающих и пищевых производств» всех форм обучения и иностранных студен-
тов

Ил.50. Табл. 3. Библиогр.: 16 назв.

ISBN

ББК 36-1 я 7

© М.Г. Зинченко, 2008

для микробиологического синтеза. Наряду с традиционными источни-
ками углеродного сырья – углеводами применяют жидкие и газообраз-
ные углеводороды (н-парафины, природный газ и т.д.) и их окисленные
производные (метанол, этанол); ведутся работы по использованию мо-
лекулярного водорода. Большое внимание уделяется применению раз-
личных отходов промышленности, сельского и лесного хозяйства.

В последнее время значительно расширились области применения
продукции, полученной микробиологическим синтезом. Микробиология
внедрилась в такие традиционно небиологические производства, как
получение энергетического сырья (биогаз), добыча нефти, металлов.

Эра новейших биотехнологических процессов, возникшая в тече-
ние последних 25–30 лет, связана с использованием иммобилизованных
ферментов. Бурно развивающиеся в настоящее время генетическая и
клеточная инженерия способствуют тому, что биотехнологии постепен-
но завоевывают все новые и новые области производства и решительно
внедряются во многие сферы деятельности человека.

Внедрение новейших методов биотехнологии позволяет интен-
сифицировать экологически чистые технологии воспроизводства пищи и
кормовых препаратов, решать задачи обеспечения человечества матери-
альными и энергетическими ресурсами, а также проблемы охраны
окружающей среды.

ства антибиотиков обусловила значительное повышение роли технических наук в микробиологической промышленности.

Опыт производства антибиотиков оказал также принципиальное влияние на развитие других отраслей микробиологической промышленности. Ферменты микроорганизмов (бактерий и грибов) стали постепенно вытеснять ферменты растительного и животного происхождения. В 1948 г. было показано, что с помощью микроорганизмов можно получать витамин В₁₂, который ни растения, ни животные не синтезируют.

После второй мировой войны в ходе интенсивного развития промышленных биотехнологий были организованы производства аминокислот, белка одноклеточных, превращение стероидов, освоено культивирование клеток животных и растений. Резко расширились исследования по селекции и генетике микроорганизмов. Использование физических и химических мутагенов позволило значительно увеличить продуктивность исходных штаммов, а, следовательно, и производительность предприятий.

Важным достижением промышленной микробиологии была разработка теории и широкое практическое внедрение непрерывного культивирования микроорганизмов. Эмпирически разработанные полуперерывные системы культивирования, при которых через определенные промежутки времени отбирается часть среды и добавляется эквивалентное количество свежей среды, применялись давно. Например, так получали уксус по методу, разработанному в 1823 г. немецким ученым Шюценбахом. Непрерывное спиртовое брожение в батарее аппаратов было разработано в начале века С. В. Лебедевым. Однако широкое внедрение в промышленность метода непрерывного культивирования началось лишь во второй половине XX в. после разработки математической основы теории этого процесса, изучения основ регуляции роста и развития микроорганизмов, способов воздействия на их обмен веществ и создания аппаратуры для строгого контроля параметров культивирования.

Неуклонно возрастает количество видов сырья, используемого

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы в Украине наметился рост объемов производства в экспортно-ориентированных отраслях промышленности, к которым принадлежит и пищевая промышленность. По объемам производства пищевая промышленность с 2002 года занимает второе место после черной металлургии; при этом спрос на отечественные продукты неуклонно растет, и через торговую сеть реализуется 95 % продовольственных товаров отечественного производства. Повышение конкурентоспособности на рынке украинской продукции связано, кроме прочего, с совершенствованием традиционных и разработкой новейших технологий переработки сырья, к которым в первую очередь относятся биологические технологии, основанные на принципах управляемого микробного синтеза. Достижения биотехнологии позволяют ускоренными темпами развивать микробиологическую промышленность, в частности, производство пищевого белка, органических кислот, витаминов, ферментов, пива, спирта, напитков и проч.

Для студентов, специализирующихся в области оборудования и технологии пищевых производств, важно овладеть знаниями по биохимии, промышленной микробиологии, биоинженерии, детально ознакомиться с промышленными процессами, основанными на применении микроорганизмов, иметь представление о перспективах их развития.

В задачу настоящего учебного пособия входило осветить основные разделы современной промышленной микробиологии, дать представление о процессах, на которых базируются пищевые биотехнологические производства, и рассмотреть важнейшие из них.

Учебное пособие включает «Введение», в котором содержится краткий очерк истории возникновения и развития промышленной микробиологии. Весь материал, излагаемый в книге, распределен по 6 главам.

В *первой* главе рассматриваются свойства микроорганизмов, имеющие особое значение для практического использования в производстве пищевых продуктов, а также особенности взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой.

Вторая глава посвящена вопросам культивирования микроорганизмов. Здесь рассмотрены закономерности роста и развития микробов, дано математическое описание кинетики роста клеток.

В *третьей* главе изложены основные принципы инженерной реализации биотехнологии пищевых продуктов, в том числе продуктов брожения. Материал излагается в соответствии с этапами осуществления биотехнологического производства: подготовка биологического объекта, приготовление и стерилизация жидких питательных сред, культивирование микроорганизмов, выделение и очистка целевых продуктов. Описаны методы иммобилизации клеток и ферментов.

В *четвертой* главе рассмотрены важнейшие биохимические процессы (превращение безазотистых и азотсодержащих субстратов), используемые в пищевых производствах, а также некоторые вопросы специальной микробиологии: общие принципы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля пищевых производств, дезинфекция в пищевой промышленности.

В *пятой* и *шестой* главах приведены примеры промышленной реализации процессов микробного синтеза. В пятой главе рассмотрена технология получения микробной биомассы на примере производства хлебопекарных дрожжей; в шестой – получение продуктов брожения на примере производства пива. Процессы рассмотрены в технологическом аспекте с краткой характеристикой биохимии и микробиологии каждого производства.

Пособие соответствует учебной программе дисциплины «Биохи-

ляной кислот, а в 30-х годах — ацетона и бутилового спирта. Исследования по химизму образования лимонной кислоты грибами, проведенные под руководством В. С. Буткевича и С. П. Костычева, позволили организовать в 1933 г. ее первое промышленное производство в бывшем СССР. Большое значение имели работы по использованию целлюлозного сырья для получения спирта, фурфурола, кормовых дрожжей и других продуктов. В 30-е годы в СССР было организовано производство микробиологическим способом технических препаратов некоторых ферментов и витаминов (эргостерин — провитамин B₂).

Приоритетным достижением было открытие советскими учеными Г. А. Надсоном и Г.С. Филипповым (1925) мутагенного действия рентгеновского излучения на микроорганизмы. С начала 40-х годов в разных странах микроорганизмы стали объектом интенсивных генетических исследований. В начале XX в. были введены термины «мутация», «ген», возникла гипотеза о том, что хромосомы являются материальными носителями наследственных признаков. Русский цитолог С. Г. Навашин раскрыл особенности структуры хромосом и заложил основы хромосомной теории наследственности.

Таким образом, в начале этого периода (40-е годы XX в.) происходило в основном совершенствование технологии существующих производств, а затем, благодаря успехам микробиологии, биохимии и других наук, в результате усовершенствований аппаратуры и технологий возникла основа для организации новых производств. В этот период стали выпускать новые экологически чистые биоудобрения и биологические препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений, возникли производства органических растворителей, спиртов, начались промышленные испытания биотехнологических процессов переработки и использования растительных отходов.

Революционным моментом данного периода была промышленная реализация технологии производства антибиотиков, применение которых имело огромное значение в лечении инфекционных болезней. Необходимость же разработки аппаратуры для организации производ-

сти.

В XIX в. с развитием химических наук были заложены основы органической химии. В этот период были открыты многие органические кислоты, глицерин, холестерин, глюкоза, первые аминокислоты. Стали закладываться научные основы биологической обработки и обезвреживания стоков. Очистные сооружения, известные со времен Древней Индии и Римской империи и пришедшие в упадок в средние века, с бурным развитием промышленности на рубеже XIX–XX вв. вновь стали предметом пристальных исследований. В этот период начала складываться энзимология.

Огромный вклад в развитие микробиологии внесли русские и советские ученые: И. И. Мечников, Д. И. Ивановский, Н. Ф. Гамалея, Д. К. Заболотный, Л. С. Ценковский и др. Большая роль в развитии технической микробиологии принадлежит С. П. Костычеву, С. Л. Иванову и А. И. Лебедеву, которые изучили химизм процесса спиртового брожения, вызываемого дрожжами.

В начале XX в. началось преобразование пищевой промышленности из кустарных производств в крупные. Это требовало проведения процессов по заранее установленным технологическим схемам. На теоретическую разработку биохимических и микробиологических процессов, лежащих в основе технологии приготовления пищевых продуктов, были направлены усилия ряда ученых. В. Л. Омелянский, В. А. Николаев, Г. Л. Селибер и другие исследователи изучали микроорганизмы хлебопекарного производства и разрабатывали научные основы брожения теста. Работы С. А. Королева, А. Ф. Войткевича и других ученых по микробиологии молока и молочных продуктов способствовали развитию этой отрасли производства.

Для подъема сельского хозяйства проводили исследования по бактериальным удобрениям и силосованию кормов.

Развивались и новые микробиологические производства. На основе исследований В. Н. Шапошникова и его сотрудников в 20-х годах было разработано микробиологическое производство молочной и мас-

мические и микробиологические основы пищевой и бродильной технологии» специальности «Оборудование перерабатывающих и пищевых производств» направления подготовки „Инженерная механика” и предназначено для всех форм обучения студентов.

До настоящего времени аналогичного учебного пособия по данному направлению в Украине не издавалось.

ВВЕДЕНИЕ

Пищевая отрасль является одной из старейших отраслей хозяйственной деятельности человека. По сути, пищевая технология была одной из первых, а мельница была первым пищевым предприятием.

Особенностью пищевой технологии является переработка сырья растительного и животного происхождения. В основе методов такой переработки лежат закономерности физики, химии, биологии, так как каждый технологический процесс является совокупностью физических, химических, биологических воздействий на сырье и полуфабрикаты. В связи с многообразием способов производства пищевых продуктов целесообразно разделить их на группы на основе общности основных процессов обработки сырья и полуфабрикатов, а именно:

- *группа производств, основанных на процессах брожения.* К ней относятся производства пива, спирта, вина, кисломолочных продуктов, выпечка хлеба. Особенностью этих производств является использование в технологии микроорганизмов, вызывающих сбраживание углеводов;
- *группа производств, основанных на физико-химических процессах.* Это производство сахара, крахмала, растительных масел и т.п. Общим для них являются физические способы извлечения из сырья полезных веществ (диффузионное или экстракционное извлечение сока из плодов, масла из масличного семени) и химические методы их дальнейшей обработки;
- *группа механико-теплофизических производств.* Она включа-

изучение химических превращений стали важной предпосылкой для становления микробиологии и биохимии.

Плодотворные исследования в направлении изучения микроорганизмов были начаты в 40-х годах XIX в. Французский ботаник Ш. Каньяр-де-Латур (1837) высказал мысль, что брожение вызывают дрожжи, которые, по его мнению, имеют растительное происхождение. Одновременно к такому же выводу пришли немецкие ученые Т. Шванн и Ф. Кютцинг. Однако теория о биологической природе брожения подверглась атаке со стороны высокоавторитетных химиков – Ю. Либиха, Ф. Вёлера, И. Я. Берцелиуса. Общепринятым было мнение Либиха о том, что брожение – это химическое явление, вызываемое в разнообразных телах разлагающимися белковыми веществами.

Формирование микробиологии как науки связано с работами знаменитого французского ученого Луи Пастера (1822–1895). В истории мировой науки трудно найти другого исследователя, чьи работы имели бы такое большое теоретическое значение и вместе с тем дали бы такой большой практический эффект. К. А. Тимирязев считал, что Пастер оказал такое влияние на практические стороны человеческой деятельности, какого не оказывал ни один человек за всю историю цивилизации. Работая в области прикладной микробиологии, Пастер сделал ряд крупнейших фундаментальных открытий, которые заложили основы современной промышленной микробиологии. Пастер неоспоримо доказал, что болезни, порча продуктов, брожение и гниение вызываются микроорганизмами, и создал теорию об экзогенности попадания этих организмов в среду. Этим была доказана несостоятельность бытующей в то время теории самозарождения микроорганизмов. Работы Пастера заложили научные основы виноделия, пивоварения, производства спирта и уксуса, борьбы с инфекционными болезнями. Многие рекомендации Пастера, в частности, прогрев до температур, уничтожающих вредные микроорганизмы, но не влияющих на качество продукта (впоследствии получивший название пастеризации), широко применяются и сейчас в винодельческой, молочной и других отраслях пищевой промышленно-

вначале применяли только в медицине под названием «Aquata vitae» – вода жизни. Водка вошла в быт позже. В Европе заводы, производящие винный спирт, появились в середине VII в. Получение этилового спирта описано в Вятской летописи XII в.

С развитием скотоводства и земледелия и появлением в результате этого некоторых излишков пищи возникла необходимость разработки методов хранения продуктов. Использовали сушку, замораживание, соление, квашение, а также исключали доступ воздуха для остановки аэробных процессов разложения (например, мясо заливали жиром). Интересно отметить, что многие практические приемы, использующиеся для приготовления пищи, напитков и для их хранения, разработанные в различных странах, были идентичны.

Во второй половине XV в. начинается развитие современного естествознания. На становление и развитие биологии существенное влияние оказали успехи химии, которая из описательной в этот период превращается в аналитическую. Произошли сдвиги в изучении сущности процессов брожения, появился термин «ферментация», а процесс брожения стали связывать с наличием в среде дрожжей или ферментов. В XVI–XVII вв. сначала во Франции, а затем повсеместно для разрыхления теста стали использовать пивные дрожжи; позднее, с изменением и совершенствованием технологии пивоварения, для этих целей стали применять дрожжи спиртовых производств.

В этот же период удалось впервые увидеть микроорганизмы. Их обнаружил голландский натуралист А. Левенгук с помощью сконструированного им однолинзового микроскопа, дающего увеличение в 280 раз. Создание к середине XVIII в. достаточно сильных оптических приборов позволило описать большое количество микроорганизмов. Это, как отмечал К.А. Тимирязев, был блестящий дебют микроскопа.

В это же время была доказана способность одного вещества разлагать другое, что послужило началом экспериментального изучения уникальной способности ферментов к катализу специфических химических реакций. Таким образом, развитие описательной микробиологии и

ет в себя мукомольно-крупяное, макаронное, кондитерское, консервное производства. В основе производства продуктов этой группы лежат механические процессы смешивания, разделения, сепарирования, дробления, измельчения и различные теплофизические процессы (выпечка, сушка, обжарка, стерилизация);

- *химические производства.* Это получение патоки, пищевой глюкозы, жировых продуктов (маргарина, майонеза) путем переработки сырья химическими методами.

В современной пищевой промышленности особое место занимают производства первой группы, базирующиеся на жизнедеятельности микроорганизмов, так называемые биотехнологические производства. Интенсивное развитие биотехнологии, в том числе биотехнологии пищевых производств, в последние десятилетия обусловлено не только успехами биологии, но и кризисом традиционной технологии, связанным с подорожанием или полным исчерпанием природных сырьевых ресурсов.

Пищевые микробиологические производства имеют многостадийный характер и включают, наряду с микробиологическими стадиями, ряд других (нагревание, дозирование, фильтрование и др.), которые обеспечивают осуществление основных микробиологических процессов, и от качества которых зависит получение конечного результата.

Основными компонентами биотехнологического процесса являются: биологический агент (культура микроорганизмов), субстрат, целевой продукт, аппаратура и совокупность методов управления процессом. Разработка оптимальной биотехнологии определенного вида продукции – сложная научно-техническая задача, для решения которой необходимо:

- выбрать или селекционировать культуру микроорганизмов, способную с максимально возможной скоростью синтезировать биомассу или требуемый метаболит;
- выбрать сырье, содержащее вещества, необходимые для роста используемой культуры;

- выбрать или сконструировать аппарат (ферментер), пригодный для выращивания данной культуры, оснащенный соответствующими коммуникациями и вспомогательным оборудованием;
- подобрать оборудование и разработать технологию выделения и очистки целевого продукта.

Таким образом, производство продуктов микробного синтеза, в том числе пищевых – это технологический комплекс, биотехнологическая система, создаваемая из типовых процессов (подсистем), в каждом из которых осуществляются соответствующие физические, химические и биологические превращения. Такой системный подход положен в основу расчета и управления отдельными процессами и технологическими линиями, соблюдения требований национальных и международных стандартов качества пищевых продуктов, проектирования машин и аппаратов пищевых производств.

Биотехнология является воплощением результатов фундаментальных исследований физиологии, биохимии, генетики микроорганизмов, проводимых в рамках одного из важнейших разделов микробиологии – промышленной (технической) микробиологии.

В современном понимании промышленная микробиология – это наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для получения индустриальным способом ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Частью промышленной микробиологии является микробиология пищевых производств, которая разрабатывает методы получения пищевых продуктов при помощи различных микроорганизмов, а также способы предотвращения порчи пищевых продуктов, вызываемой микроорганизмами.

Современная промышленная микробиология – относительно молодая наука, возникшая примерно 300 лет назад. Однако она имеет глубокие исторические корни.

Краткий очерк развития промышленной микробиологии

Человек с древних времен начал использовать деятельность

микроорганизмов, не подозревая об их существовании. К примеру, хлебные напитки, напоминавшие современное пиво, изготавливали за 7000 лет до н. э. Технология приготовления пива была высоко развита в Вавилоне, откуда она была заимствована Египтом, Персией, Грецией и другими странами. В Германии пивоварением начали заниматься одновременно с земледелием. В Армении в IV в. до н. э. умели готовить крепкое пиво. С IX в. пиво получило довольно широкое распространение в России.

В качестве опьяняющего напитка многие народы древности использовали также перебродивший виноградный сок – вино. В пирамидах Египта сохранились рисунки, изображающие технологию приготовления вина. Около двух тысяч лет назад начало развиваться виноделие во Франции, а затем и в других странах Европейского континента. На территории бывшего Советского Союза (в Грузии, Армении, на побережье Азовского моря) вина также стали изготавливать с давних времен. Бродильные напитки в древности готовили не только из винограда, но и из других ягод (малины, ежевики, кизила). Азиатские степные народы сбраживали в кожаных мешках кобылье молоко, превращая его в кумыс, японцы готовили саке – алкогольный напиток из риса.

Процессы брожения использовались и при приготовлении теста, хотя хлебопечение было "изобретено" позднее пивоварения. В пирамидах Египта, построенных около 6000 лет назад, находили караваи хлеба. Египтяне для приготовления хлеба использовали осадки бродящего пивного сусла. С незапамятных времен хлебные лепешки готовили в Средней Азии и других регионах.

История оставила мало документов о времени возникновения изготовления кисломолочных продуктов. Однако можно утверждать, что их приготовление было известно уже в начале развития животноводства. До сих пор сохранились народные способы приготовления различных национальных продуктов, получаемых на основе молочнокислого и спиртового брожения: простокваша, кефир, кумыс, мацони, аэран и др.

Значительно позже научились получать этиловый спирт. Спирт

и фаг, действуя как шприц, впрыскивает свою ДНК внутрь клетки. Фаговая ДНК так перестраивает механизм обмена бактерии, что в ней начинают синтезироваться частицы фага. Через определенное время все содержимое клетки превращается в зрелые фаговые частицы, оболочка клетки растворяется, и фаги выходят наружу.

Бактериофаги наносят большой вред производству молочных продуктов (сыра, творога, сметаны), маргарина. Они поражают в основном молочнокислые стрептококки заквасок, используемых для получения этих продуктов. Под влиянием бактериофага клетки стрептококков лизируются (растворяются) и погибают.

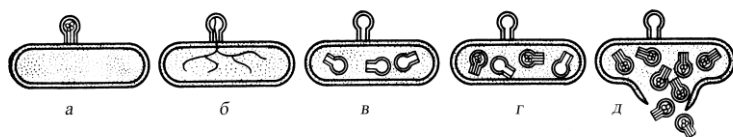


Рисунок 1.9 – Схема развития фага в бактериальной клетке:
а – адсорбция; б – переход ДНК в клетку; в – перестройка обмена веществ в клетке; г – образование новых частиц бактериофага; д – растворение клеточной стенки

1.3. Химический состав клеток микроорганизмов

1.3.1. Элементный состав клетки

На всех уровнях строения живых организмов в их состав обязательно входят 16 важнейших элементов: С, О, N, H, P, S, Fe, Cu, Na, K, Ca, Mg, Co, Cl, I, Mn. Их называют элементами жизни. В клетках некоторых организмов обнаружены и другие элементы, такие как Zn, Al, Mo, Si, V, B.

Углерод, кислород, азот и водород – основные органогены, доля которых в общей массе клетки может достигать 92 – 98 %. Все четыре элемента обладают рядом общих свойств, из которых важнейшее – их способность образовывать ковалентные связи. Бесчисленное множество разнообразных химических соединений возникает благодаря способно-

роорганизмы в третье царство живой природы и назвал его «царство протистов». Основу строения всех клеток протистов, как и клеток высших животных и растений, составляют цитоплазма и ядро. Однако развитие электронной микроскопии позволило выявить принципиально важные отличия во внутренней структуре клеток протистов. Оказалось, что несмотря на общность структурной, биохимической и физиологической организации, присущую всем живым организмам, царство протистов можно четко разделить на две большие группы: эукариот и прокариот.

К *эукариотным* микроорганизмам относятся многие водоросли, грибы и простейшие. По строению клеток они принципиально не отличаются от макроорганизмов, включая высшие растения и животных, которые также являются эукариотами. Для всех эукариот характерно наличие в клетках ядра, окруженного мембраной и содержащего набор хромосом, в которых находится ДНК, несущая основную генетическую информацию. У части эукариотных микроорганизмов, наряду с вегетативным и бесполом размножением, выявлена способность к половому процессу.

Прокариоты, или бактерии, объединяют только микроформы. Организация их клеток более простая, чем у эукариот. Ядро прокариот, называемое *нуклеоидом*, не окружено мембраной и представлено одной молекулой ДНК кольцевого характера. Митохондрии и другие обособленные органеллы, свойственные эукариотам, у прокариот отсутствуют, а их функции выполняют клеточная мембрана и (или) внутриклеточные мембраны, которые обычно из нее образуются. Размножение бактерий чаще всего происходит путем бинарного деления, реже почкованием, образованием экзоспор или другими бесполовыми способами.

Иногда к микроорганизмам относят и вирусы. Но чаще их рассматривают как особую категорию биологических объектов, поскольку они не имеют клеточного строения, содержат в отличие от эукариот и прокариот лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) и размножаются только в клетках хозяина, каковыми могут быть разные

организмы, в том числе бактерии.

Таким образом, граница, разделяющая все клеточные формы жизни на две группы, соответствующие двум типам клеточной организации, проходит через царство протистов.

Наука о распределении живых организмов по отдельным группам – таксонам – называется *систематикой*. *Классификация и номенклатура* – две основные области систематики. Основная единица в системе живых организмов – вид. Под *видом* подразумевают совокупность организмов, имеющих общее происхождение, характеризующихся общими морфологическими и физиологическими признаками и приспособленными к существованию в определенных условиях внешней среды. Виды объединяют в таксоны более высокого ранга – роды. *Роды* в свою очередь группируют в *семейства*, *семейства* – в *порядки*, *порядки* – в *классы* и т.д. Высшим уровнем таксонометрической иерархии является *царство*.

Для наименования вида принята бинарная номенклатура. Видовое название складывается из двух слов. Первое обозначает род и пишется с прописной буквы, второе – вид, к которому принадлежит организм, – пишется со строчной буквы.

Пример: дрожжи рода *Candida* могут относиться к видам *utilic*, *scottii*, *tropicalis* и др.

Отличительные признаки микроорганизмов – ничтожно малые размеры и простота биологической организации. Величина микробов измеряется микро- или нанометрами и колеблется в значительном интервале для организмов разных систематических групп. Большинство даже самых крупных представителей микромира по величине не превышает 100 мкм. Мельчайшие микроорганизмы (ультрамикробы) имеют размеры 0,016–0,26 мкм. Благодаря небольшим размерам микроорганизмы легко перемещаются с токами воздуха, по воде и другими способами. Поэтому они быстро распространяются и встречаются в самых разных местах, включая и те, где другие формы жизни отсутствуют.

Микроорганизмам принадлежит важная роль в природных про-

микроскоп. Размеры вирусов колеблются от 10 – 12 нм (вирусы ящура, полиомиелита) до 200–250 нм (вирусы оспы, герпеса). Особенность паразитизма вирусов заключается в том, что они действуют на генетическом уровне. Не обладая свойственной любой клетке способностью к синтезу белка, они внедряют в клетку свой генетический материал, в результате чего клетка начинает синтезировать вирусные частицы.

Вне клетки вирусы существуют в виде *вирионов* – вирусных частиц, находящихся в покоем состоянии. Вирионы обнаруживаются в воздухе, почве, природной и сточной воде. Размер, форма и химический состав вирионов очень разнообразны. В вирусной частице различают две основные структуры: белковую оболочку и генетический материал вируса, представленный одной молекулой ДНК или РНК.

Вирусы могут быть паразитами не только для человека, животных, растений, но и для микроорганизмов – грибов, бактерий. Такие вирусы получили название *фагов* (буквально фаг – пожиратель). Вирусы бактерий называются *бактериофаги* (пожиратель бактерий), грибов – *микофаги*. Размеры фагов колеблются от 40 до 140 нм. На рис. 1.8 показано строение бактериофага.

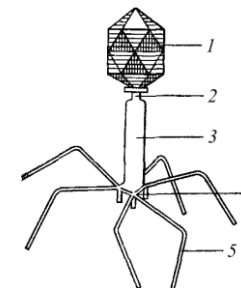


Рисунок 1.8 – Схема строения бактериофага

Фаг имеет головку 1, внутри которой заключена ДНК, полый стержень 2, покрытый чехлом 3, базальную пластинку с шипами 4 и отростки 5. Отростки способствуют адсорбции фаговой частицы на поверхности клетки. Чехол бактериофага способен сокращаться. При его сокращении стержень проходит через клеточную стенку и мембрану,

Процесс образования споры протекает несколько часов. Когда спора сформируется, оболочка и остальные части клетки разрушатся, и спора освобождается. Особенность бактериальных спор – их высокая термостойкость. Например, споры возбудителя тяжелого пищевого отравления – ботулизма – выдерживают нагревание до 100 °С в течение 5–6 часов. Споры выносят высушивание, воздействие ультрафиолетовых лучей, ядовитых веществ и т.п. Устойчивость спор связана с тем, что их покровы труднопроницаемы, в них содержится много липидов и кальция. Активность ферментов в них подавлена. Высокая термоустойчивость спор обусловлена низким содержанием в них воды, что предохраняет белки от денатурации при высоких температурах.

Споры бактерий могут сохранять жизнеспособность десятки и даже сотни лет. Попадая в благоприятные условия, спора прорастает. Процесс превращения споры в растущую (вегетативную) клетку начинается с поглощения ею воды и набухания. При этом происходят глубокие физиологические изменения: усиливается дыхание, активизируются ферменты, под действием которых растворяются оболочки, и спора прорастает в вегетативную клетку. В этот же период спора теряет свою термоустойчивость.

Порчу пищевых продуктов вызывают лишь вегетативные клетки бактерий. Поэтому необходимо знать условия, способствующие образованию спор и их прорастанию в вегетативные клетки, чтобы правильно выбрать способ обработки пищевых продуктов с целью предотвращения их порчи под влиянием бактерий.

1.2.3. Ультрамикробы

Ультрамикробы – единственные представители живого мира, не имеющие клеточного строения. К ним относятся вирусы – внутриклеточные паразиты, поражающие клетки животных, растений и микроорганизмов. Они были открыты в 1892 г. русским ботаником Д. И. Ивановским при изучении болезни табака – табачной мозаики. Это мельчайшие организмы, которые удалось увидеть только в электронный

микроскоп, а также в практической деятельности человека. Объясняется это рядом причин.

Важным свойством микроорганизмов является их способность к быстрому размножению. Известны бактерии, которые делятся каждые 30–60 мин. и даже через 8–10 мин. В результате из одной клетки массой около $2,5 \cdot 10^{-12}$ г за 2–4 суток в условиях, обеспечивающих активный рост, могла бы образоваться биомасса порядка 10^{10} т и более. В действительности этого не происходит, так как действуют разные ограничивающие факторы. Но возможности микроорганизмов к быстрому размножению намного превосходят возможности растений и животных.

Еще одна важная особенность микроорганизмов – их способность приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Исключительная пластичность обменных процессов позволяет микробам с большей или меньшей легкостью адаптироваться к самым разнообразным физическим и химическим факторам окружающей среды.

Третье, что характеризует микроорганизмы, – это разнообразие их физиологических и биохимических свойств. В результате некоторые из них могут расти в так называемых экстремальных условиях, которые для большинства других организмов неблагоприятны или вообще не поддерживают рост.

1.2. Морфологическая характеристика микроорганизмов

Морфология микроорганизмов изучает форму и особенности строения клеток, их способность двигаться, способы размножения и др.

Основными объектами микробиологии пищевых производств являются грибы, дрожжи и бактерии – наиболее значимые для народного хозяйства микроорганизмы. Разнообразные функции, которые осуществляют микроорганизмы в процессе жизнедеятельности, обусловлены высокой степенью организации клеток и их сложной структурой.

1.2.1. Структура эукариотической клетки

К микроорганизмам-эукариотам относятся грибы и дрожжи. Гри-

бы составляют обширную группу организмов совершенно особой биологической организации (рис. 1.1 *а, б*). Тело большинства грибов состоит из тонких нитей – *гиф*, образующих разветвленную структуру, называемую *мицелием*. Гифы представляют собой жесткие трубочки, заполненные многоядерной цитоплазмой. Грибы питаются, поглощая всей поверхностью тела разнообразные органические вещества. Основное место обитания грибов – почва, но некоторые виды живут и в водной среде. Среди грибов есть много форм, паразитирующих в живых организмах, в том числе в организме человека, и вызывающих их заболевания.

В основу систематики грибов положены способы размножения. Типы бесполого размножения очень разнообразны: с помощью спор, путем почкования, обрывками гиф. Бесполое размножение чередуется с половым, которое, как и у всех эукариот, заключается в слиянии двух ядер. Различают низшие и высшие грибы. Низшие, или примитивные, грибы относятся к классу фикомицетов. Мицелий фикомицетов несептирован, т. е. гифы не имеют поперечных перегородок. Споры образуются внутри специальных структур.



Рисунок 1.1 – Грибы: *а* – *Mucor mucedo*; *б* – водный фикомицет; *в* – дрожжи

Высшие грибы имеют септированный мицелий. В гифах этих грибов через определенные промежутки образуются поперечные перегородки. Многие высшие грибы широко используются в пищевой промышленности. Например, отдельные виды грибов рода *Aspergillus* применяют при производстве лимонной кислоты, ферментных препаратов, а

зуют в воде нити и хлопья. Бурное развитие этих бактерий может привести к зарастанию труб.

Каждому виду бактерий присущи определенные форма и размер, на которые значительное влияние оказывают условия роста.

Спорообразование. Некоторые виды бактерий, главным образом палочковидные, способны образовывать споры. Обычно спорообразование индуцируется неблагоприятными условиями среды: понижением содержания влаги, отсутствием питательных веществ, изменением pH и т. д. Спорообразование – сложный процесс, в результате которого в клетке формируется эндоспора, отличающаяся от вегетативной клетки структурой и химическим составом (рис. 1.7).

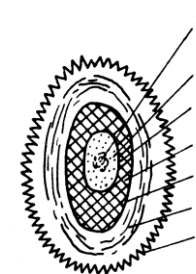


Рисунок 1.7 – Схема строения бактериальной споры:
1 – нуклеоид; 2 – цитоплазма; 3 – внутренняя мембрана; 4 – кортекс; 5 – наружная мембрана; 6 – многослойные покровы; 7 – экзоспориум

Процесс начинается с обезвоживания и уплотнения цитоплазмы в ядерной зоне и обособления этой зоны с ДНК с помощью перегородки, образующейся из цитоплазматической мембраны. Затем на отсеченном участке цитоплазмы формируются двухслойная мембрана – наружная и внутренняя, – между которыми располагается *кортекс* (кора), сходный по химическому составу с клеточной стенкой вегетативной клетки и выполняющий защитные функции. Поверх наружной мембраны образуются многослойные покровы споры, состоящие в основном из белков.

подразделяют на вибрионы, спириллы и спирохеты. Самые мелкие из них — *вибрионы*, имеющие вид запятой.

Длина клетки вибрионов не превышает 1–3 мкм. Клетки *спирилл* длиной от 5 до 30 мкм имеют один или несколько завитков. Характерная особенность *спирохет* — крайне малый диаметр клетки (0,1–0,6 мкм) при относительно большой (5–500 мкм) длине тела. Клетки спирохет имеют вид штопора, покрыты эластичной оболочкой, позволяющей им винтообразно изгибать тело.

Несколько особняком стоят нитчатые бактерии, представляющие собой длинные нити из соединенных вместе палочковидных клеток, покрытых общей тонкой оболочкой — *чехлом*.

Нитчатые бактерии — типичные водные организмы. Нити их имеют толщину в среднем 1–7 мкм. Нитчатые бактерии относятся к числу наиболее крупных, некоторые из них видны даже невооруженным глазом.

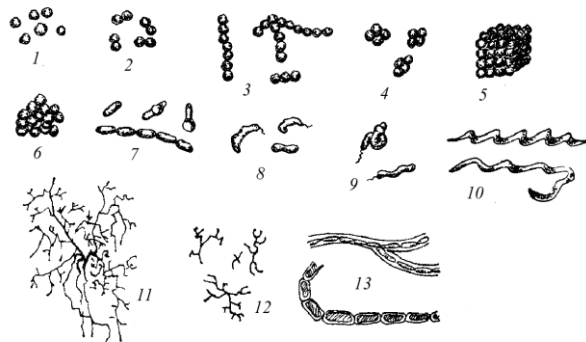


Рисунок 1.6 – Морфологические типы бактерий:

1 – монококки; 2 – диплококки; 3 – стрептококки; 4 – тетракокки; 5 – сарцины; 6 – стафилококки; 7 – палочки; 8 – вибрионы; 9 – спириллы; 10 – спирохеты; 11 – актиномицеты; 12 – микобактерии; 13 – нитчатые бактерии

Среди нитчатых бактерий наиболее известна *Sphaerotilus natans*, обитающая в сточных водах, в загрязненной проточной воде. Она обра-

грибы рода *Penicillium* используют в фармацевтической промышленности и для приготовления сыра.

Отдельную группу грибов составляют дрожжи. Это одноклеточные микроорганизмы, не образующие мицелия (рис.1.1 в). Применение дрожжей в промышленности связано с их способностью превращать сахар в этиловый спирт. Дрожжи применяют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, спиртовой промышленности. Схема строения дрожжевой клетки представлена на рис.1.2.

Дрожжи могут иметь овальную, яйцевидную или округлую форму. Размеры дрожжей варьируются у разных видов от 1,5 до 10 мкм в ширину и от 2 до 20 мкм (иногда до 50 мкм) в длину. Клетки дрожжей, как и всех эукариот, имеют хорошо развитый мембранный аппарат — цитоплазматическую мембрану, эндоплазматическую сеть, аппарат Гольджи, митохондрии.

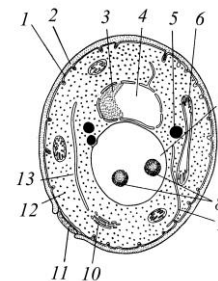


Рисунок 1.2 – Схема строения дрожжевой клетки:

1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – клеточная стенка; 3 – ядрышко; 4 – ядро; 5 – жировые капли; 6 – митохондрии; 7 – вакуоль; 8 – гранулы полифосфата; 9 – мембраны аппарата Гольджи; 10 – диктиосомы; 11 – почковый рубец; 12 – рибосомы; 13 – цитоплазма.

В цитоплазме имеется ядро, вакуоли, включения запасных питательных веществ: липидов, гликогена и др. Клеточные структуры выполняют специфические функции.

Клеточная стенка играет роль механического барьера. Она за-

щищает клетку от воздействия внешней среды, поддерживает осмотическое давление в клетке, участвует в транспорте питательных веществ и метаболитов. Благодаря пористости стенки, диаметр пор которой составляет около 3 нм, в клетку проникают в основном низкомолекулярные вещества (вода, соли, сахара, углеводороды и др.) и выводятся продукты метаболизма (диоксид углерода, аминокислоты, спирты, кислоты и др.).

В состав клеточной стенки входят полисахариды (70 % сухой массы), липиды, белки и др. Толщина ее составляет около 400 нм.

Цитоплазматическая мембрана – тонкая (7–8 нм) мембрана, расположенная под клеточной стенкой и отделяющая ее от цитоплазмы. Она обеспечивает избирательный транспорт питательных веществ из окружающей среды в клетку и вывод метаболитов из клетки. Мембрана состоит из бимолекулярного слоя липидов, в который включены белковые молекулы. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану осуществляется путем обычной молекулярной диффузии (по градиенту концентрации) и с помощью механизмов активного транспорта, в которых участвуют специфические ферменты. В этом случае вещества могут проникать в клетку и против градиента концентраций. Активный транспорт веществ сопряжен с затратой энергии и осуществляется через мельчайшие отверстия в цитоплазматической мембране – *поры*. Сквозь них в клетку проникают ионы и молекулы. Например, аминокислоты легко проникают из среды в клетку, даже если их концентрация в цитоплазме в 100–200 раз выше, чем в окружающей среде.

Цитоплазма – основная масса клетки. Она заключена в оболочке клетки и представляет собой коллоидный раствор аминокислот, ферментов, углеводов, минеральных солей и многих других веществ в воде. В цитоплазме находится целый ряд оформленных структур, имеющих закономерные особенности строения и поведения. Каждая из этих структур несет определенную функцию. Отсюда возникло их сопоставление с органами целого организма, в связи с чем они получили название *органойды* или *органеллы*. Это митохондрии, аппарат Гольджи,

клетки, придавая ей определенную форму, защищает ее от воздействия внешней среды, обеспечивает необходимую механическую прочность. У некоторых видов бактерий на поверхности клетки образуется слизистая капсула. Она служит дополнительным осмотическим барьером, предохраняющим клетку от высыхания и механических повреждений

У бактерий выделяют три основные формы клетки: сферическую, цилиндрическую и извитую.

Сферические, или шаровидные, бактерии называются *кокками* (от греч. *coccus* – ягода). У разных видов бактерий закономерность расположения клеток после деления неодинакова (рис.1.6). В зависимости от этого различают:

- 1) *монококки* – одиночные клетки;
- 2) *диплококки*, группирующиеся попарно, так как деление клетки происходит в одной плоскости;
- 3) *стрептококки*, клетки которых также делятся в одной плоскости, но особи не отделяются друг от друга и формируют длинные цепочки;
- 4) *тетракокки*, образующие группы из четырех клеток, что обусловлено делением клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;
- 5) *сарцины*, имеющие вид скоплений кубической формы в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях;
- 6) *стафилококки*, делящиеся неправильно в нескольких плоскостях, скопления которых напоминают кисть винограда.

Диаметр шаровидных бактерий не превышает 1–2 мкм. Цилиндрические, или палочковидные, бактерии, как и кокки, могут быть одиночными, соединяться попарно или в длинную цепочку по три и более клеток. Средняя длина палочковидных бактерий составляет 2–7 мкм при диаметре 0,5–1 мкм. Однако есть как значительно более крупные формы, так и очень мелкие, величина которых находится на грани видимости в обычные световые микроскопы (0,1–0,2 мкм).

Извитые формы бактерий в зависимости от степени изогнутости

топласт состоит из цитоплазмы и нуклеоида, окруженных цитоплазматической мембраной. В цитоплазме бактериальной клетки обнаруживается от 5 до 50 тыс. рибосом, более мелких, чем рибосомы эукариот. Огромное количество рибосом придает цитоплазме вид зернистой массы. Цитоплазматическая мембрана имеет трехслойную структуру, при этом наружные слои – белковые, а внутренний – состоит из липидов.

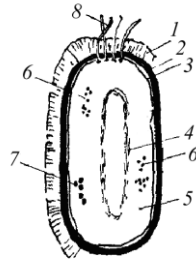


Рисунок 1.5 – Схема строения бактериальной клетки:

1 – слизистая капсула; 2 – клеточная стенка; 3 – цитоплазматическая мембрана; 4 – нуклеоид; 5 – цитоплазма; 6 – рибосомы; 7 – запасные вещества; 8 – жгутики

Функции цитоплазматической мембраны разнообразны. Обладая избирательной проницаемостью, т.е. способностью пропускать определенные соединения, мембрана играет роль органеллы, концентрирующей необходимые вещества внутри клетки и способствующей выведению наружу продуктов жизнедеятельности. Цитоплазматическая мембрана служит местом локализации разнообразных ферментов, на ее поверхности происходит синтез веществ внешних структур клетки. В цитоплазме бактерий обнаружены разнообразные включения. Одни представляют собой запасные вещества, откладываемые клеткой в период обильного питания, другие – продукты жизнедеятельности клетки, не выделяющиеся наружу. Разные виды бактерий в качестве запасных веществ откладывают полисахариды (гликоген, крахмал), липиды (гранулы и капельки жира). Один из важнейших структурных элементов бактериальной клетки – клеточная стенка. Она служит как бы скелетом

рибосомы, эндоплазматическая сеть и т.д.

Рибосомы осуществляют в клетке функцию синтеза белка. Они представляют собой сферические частицы диаметром 15–35 нм, состоящие из двух субъединиц неравных размеров и содержащие примерно равное количество белков и РНК.

В одной клетке содержатся тысячи рибосом. Синтез белка осуществляется группой, включающей до нескольких десятков объединенных рибосом. Такую группу рибосом называют полисомой (рис. 1.3).

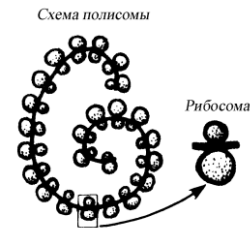


Рисунок 1.3– Схема полисомы и рибосомы

Синтезированные белки сначала накапливаются в каналах *эндоплазматической сети*, а затем транспортируются к органоидам и участкам клетки, где они потребляются. Эндоплазматическая сеть и рибосомы представляют собой единый аппарат биосинтеза и транспортировки белков.

Эндоплазматическая сеть – это мембранная система, состоящая из канальцев, пузырьков, которые не имеют строго определенной локализации, а располагаются либо по периферии клетки, либо пронизывают всю цитоплазму. На них расположены различные ферменты, ответственные за синтез липидов, углеводов, за транспорт веществ внутри клетки.

Аппарат Гольджи – система мембран, связанных с ядерной мембраной и мембранами эндоплазматической сети. Он расположен на участке цитоплазмы, где нет рибосом. В аппарате Гольджи происходит синтез материала клеточной стенки и новых мембран, с его помощью также осуществляется транспортирование веществ, синтезируемых в

эндоплазматической сети, и удаление из клетки продуктов обмена.

Митохондрии представляют собой органеллы палочковидной формы, покрытые оболочкой из двух мембран (рис. 1.4). Митохондриальные мембраны состоят из белков (80 %) и липидов (20 %).

Митохондрии размножаются самостоятельно; способность к размножению обусловлена присутствием в них молекулы ДНК.

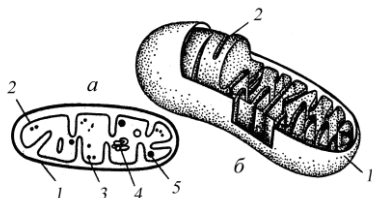


Рисунок 1.4– Схема строения митохондрии:
а – продольный разрез; б – трехмерная схема организации митохондрии: 1 – наружная мембрана; 2 – внутренняя мембрана; 3 – рибосома; 4 – кольцевая молекула ДНК; 5 – гранула-включение

Основная функция митохондрий – синтез универсального источника энергии – АТФ (аденозинтрифосфат). При распаде АТФ выделяется большое количество энергии, используемой клеткой при синтезе различных веществ, выработке тепла, необходимого при движении и других физиологических процессах.

Ядро – важнейшая составная часть клетки, обеспечивающая хранение и передачу наследственной информации. Оно содержит ядерную оболочку, ядерный сок, ядрышко, хромосомы (молекулы ДНК и связанные с ней белки). *Ядерная оболочка* отделяет ядро от цитоплазмы и состоит из двух мембран – наружной и внутренней, пространство между которыми заполнено полужидким веществом. В оболочке находится множество мельчайших пор, через которые из ядра в цитоплазму и обратно поступают белки, углеводы, жиры, вода, т.е. осуществляется непрерывный обмен веществ между ядром и протоплазмой. *Ядерный сок* – полужидкое вещество, которое находится под ядерной оболочкой и представляет собой внутреннюю среду ядра. В ядерном соке находятся

ядрышко и хромосомы.

Ядрышко представляет собой плотное округлое тельце; в нем синтезируются и скапливаются предшественники рибосом, которые затем транспортируются через поры ядра в цитоплазму. *Хромосомы* имеют форму тончайших нитей, каждая из которых представляет собой одну молекулу ДНК в соединении с белком. Хромосомы передают генетическую информацию.

1.2.2. Строение прокариотической клетки

Клетки низших протистов имеют в структурной организации ряд принципиальных особенностей по сравнению с клетками высших протистов.

Различное строение ядерного аппарата – не единственный признак, отличающий прокариотическую клетку от эукариотической. Помимо различия в генетической организации клетки важными особенностями прокариот являются:

- 1) отсутствие системы мембран, формирующих эндоплазматическую сеть;
- 2) отсутствие структурно оформленных органелл, таких, как митохондрии, комплекс Гольджи.

Особенности структурной организации обуславливают и ряд функциональных отличий клеток прокариот от клеток эукариот. Клетки огромного большинства прокариот значительно меньше эукариотических клеток, поэтому величина отношения поверхности к объему у них больше, а, следовательно, и обмен веществ с окружающей средой более интенсивен. Число форм клеток прокариот невелико. Чаще всего они имеют сферическую форму или вид прямых и изогнутых палочек.

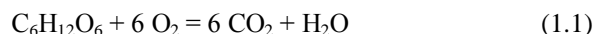
Однако физиологические особенности этой группы микробов и процессы, осуществляемые ими, поражают своим чрезвычайным разнообразием.

Обширную группу прокариот составляют бактерии. В клетке бактерий (рис.1.5) различают поверхностные структуры и протопласт. Про-

ляют единое целое. В конечном итоге энергия питательных веществ превращается в энергию, потребляемую организмом в процессе роста, развития, размножения, в энергию движения. Согласованность и быстрота всех химических реакций в клетке объясняется наличием в ней ферментов.

Процессы диссимиляции – биологического окисления сложных органических субстратов – называются еще *дыханием*. Дыхание может происходить как в присутствии кислорода, так и без него. Если дыхание происходит только в присутствии кислорода, оно называется *аэробным*, а микроорганизмы, способные только к такому дыханию, называются *строгими (облигатными) аэробами*. К ним относятся многие виды бактерий, грибы, водоросли, большинство простейших. Анаэробы не требуют для своего развития присутствия молекулярного кислорода. Среди них различают факультативные и облигатные микроорганизмы.

Факультативные, или условные анаэробы могут развиваться как в присутствии кислорода, так и без него. Они используют в процессе дыхания внутримолекулярный кислород, а в качестве кислородсодержащих веществ – нитраты. К ним относятся бактерии кишечной группы, молочнокислые бактерии, большинство дрожжей. Факультативные микроорганизмы имеют две ферментные системы, позволяющие им переключаться с аэробного дыхания на анаэробное и, наоборот – в зависимости от условий. Например, дрожжи рода *Saccharomyces* (сахаромицеты) в аэробных условиях получают энергию путем полного окисления моно- и дисахаридов до CO_2 и H_2O :



Этот процесс лежит в основе производства хлебопекарных дрожжей, где необходимо, чтобы сахар потреблялся, главным образом, на размножение дрожжей, в результате чего накапливалась бы значительная биомасса.

В анаэробных условиях необходимую для жизнедеятельности энергию дрожжи получают путем сбраживания моно- и дисахаридов по суммарному уравнению:

сти атомов С, Н, О и N легко реагировать друг с другом, образовывать одинарные и двойные связи между углеродом, кислородом и азотом. Наконец, важнейшая особенность углерода – его способность создавать стабильные молекулы с трехмерной структурой разнообразной пространственной конфигурации.

Среди зольных элементов клетки важная роль принадлежит фосфору. Он входит в состав нуклеиновых кислот, целого ряда ферментов, участвует в реакциях энергетического обмена.

Содержание металлов в клетке относительно невелико, но функции их чрезвычайно важны. В цитоплазме металлы присутствуют в виде комплексов с органическими молекулами. Основная функция большинства металлов – усиление каталитической активности ферментов.

Количественные соотношения элементов в клетках различных микроорганизмов колеблются в достаточно широких пределах. Например, некоторые виды бактерий способны накапливать внутри клеток железо или серу, у других наблюдается повышенное содержание кальция. Зная состав биомассы клетки по основным компонентам, можно вывести эмпирическую формулу для различных видов микроорганизмов.

Пример определения эмпирической формулы биомассы некоторых микроорганизмов

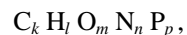
Известно, что основными компонентами, формирующими клеточное вещество, являются углерод, азот, кислород, водород и фосфор.

Содержание этих элементов в различных микроорганизмах практически постоянно (табл.1.1):

Таблица 1.1 – Содержание основных компонентов в клетках, %

Микроорганизмы	Углерод	Азот	Кислород	Водород	Фосфор
Дрожжи	47,8	10,4	31,1	6,5	4,5
Бактерии	50,4	12,3	30,5	6,8	4,0
Грибы	47,9	5,2	40,2	6,7	3,5

Приведенный элементный состав биомассы микроорганизмов (по основным компонентам) позволяет записать ее упрощенную эмпирическую формулу в виде:



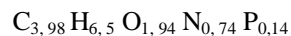
где численные коэффициенты k, l, m, n, p получают в результате деления массовой доли элемента в биомассе на атомную массу данного элемента.

Например, для дрожжей имеем:

$$C = \frac{47,8}{12} = 3,98; \quad H = \frac{6,5}{1} = 6,5; \quad O = \frac{31,1}{16} = 1,94;$$

$$N = \frac{10,4}{14} = 0,74; \quad P = \frac{4,5}{31} = 0,14$$

Тогда упрощенная эмпирическая формула дрожжей будет иметь вид:



Аналогично для бактерий имеем: $C_{4,2} H_{6,8} O_{1,9} N_{0,88} P_{0,13}$;

для грибов: $C_{3,99} H_{6,7} O_{2,5} N_{0,37} P_{0,11}$

1.3.2. Вода

Вода играет важную роль в жизни любого организма. На ее долю приходится основная часть массы клетки.

Бактериальные клетки содержат 75–90 % воды. На одну белковую молекулу в них приходится около 10 тыс. молекул воды. В клетках плесневых грибов 85–88 % воды, у некоторых простейших эта величина достигает 95 %. Чем моложе клетка, тем больше она содержит воды. В спорах бактерий воды значительно меньше, чем в растущих (вегетативных) клетках. Часть воды в клетке связана с коллоидами и входит в состав внутриклеточных органелл (рибосомы, митохондрии и т. д.), являясь, таким образом, структурным элементом клетки.

Полярная природа молекул воды обуславливает ее способность растворять и диспергировать самые разнообразные вещества. Вода –

центры и резко снижают активность фермента. Это соли тяжелых металлов (Pb, Cr), синильная кислота (HCN), антибиотики.

Клетки каждого вида микроорганизмов имеют определенный набор ферментов, характерный для данного вида (*конститутивные ферменты*). В некоторых случаях в клетке под воздействием внешних факторов, например, при изменении питания синтезируются ферменты, не свойственные данному виду в обычных условиях. Такое явление называется *адаптацией*, а синтезированные ферменты – *адаптивными*. По месту действия ферменты подразделяются на внутриклеточные (*эндоферменты*) и ферменты, которые клетка выделяет во внешнюю среду (*экзоферменты*).

1.5. Метаболизм микроорганизмов. Общие понятия об обмене веществ и энергии

Любой организм может существовать только при условии постоянного поступления питательных веществ из внешней среды и выделения в нее продуктов жизнедеятельности. Совокупность процессов превращения материи в живом организме, сопровождающихся постоянным ее обновлением, называется *обменом веществ, или метаболизмом*.

Питательные вещества, поглощаемые клеткой, в результате сложных биохимических реакций превращаются в специфические клеточные компоненты. Совокупность биохимических процессов поглощения, усвоения питательных веществ и создания за их счет структурных элементов клетки, называется *конструктивным обменом, или ассимиляцией*. Конструктивные процессы идут с поглощением энергии.

Вторая функция обмена веществ – обеспечение клетки энергией. Она обеспечивается за счет энергии химических реакций, которая освобождается в результате расщепления поступающих веществ. Эта энергия преобразуется в другие виды энергии (двигательную, тепловую). Совокупность реакций, обеспечивающих клетки энергией, называются *энергетическим обменом, или диссимиляцией*.

Конструктивные и энергетические процессы метаболизма состав-

Рисунок 1.12 – Схема механизма ферментативного расщепления

Белковая природа ферментов обуславливает их лабильность, которая выражается в том, что ферменты теряют активность под влиянием некоторых факторов. Важнейшие из них – температура и реакция среды. Зависимость активности ферментов от температуры носит сложный характер (рис.1.13). С повышением температуры активность увеличивается, но в довольно узких пределах. Максимальная активность достигается в области оптимальной температуры, после чего начинается падение активности, связанное с денатурацией белковой части фермента при повышенных температурах и потерей в результате этого каталитической активности. Оптимальная температура, как и температура, вызывающая инактивацию, для разных ферментов неодинакова. Одни ферменты начинают терять активность уже при 40 °С, другие – только при 70 °С. Почти все ферменты необратимо разрушаются при 80 °С.

Большинство ферментов имеют максимальную активность в нейтральной среде, но для некоторых оптимум рН может находиться в кислой или щелочной области значений.

Активность ферментов зависит и от присутствия в среде некоторых химических соединений.

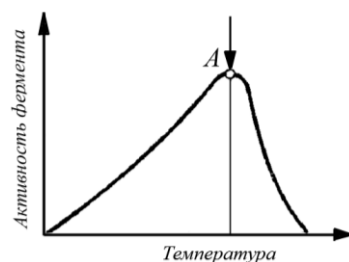


Рисунок 1.13 – Влияние температуры на активность ферментов
(точка A – оптимальная температура)

Одни повышают активность ферментов и называются *активаторами*. К ним относятся витамины и некоторые катионы: Ca, Mg, Mn. Другие химические соединения – *ингибиторы* – блокируют активные

дисперсионная среда для коллоидов цитоплазмы и растворитель ряда органических и минеральных веществ. Она служит не только средой для многочисленных и разнообразных биохимических процессов, но и сама принимает участие в таких реакциях, как гидролиз, окисление и т. д.

При низкой вязкости и способности растворять различные вещества вода выполняет и транспортные функции, обеспечивает поступление питательных веществ внутрь клетки и вывод продуктов жизнедеятельности из нее.

Вследствие высокой теплоемкости клеточная вода способна до некоторой степени поддерживать постоянство температуры клетки при изменении температуры окружающей среды.

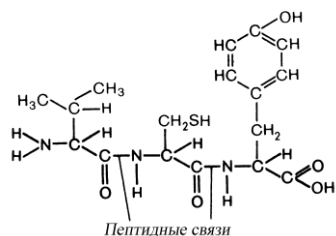
1.3.3. Органические компоненты клетки

Сухое вещество клетки на 85–97 % состоит из органических веществ, остальные 3–15 % приходятся на долю зольных элементов. Органическое или беззольное вещество клетки состоит из четырех основных компонентов: белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. Молекулярная масса этих соединений достигает 10^3 – 10^9 . Исключение составляют липиды, однако и они способны образовывать структуры с высокой молекулярной массой.

Белки. Содержание белков в клетке составляет 50–80 % от сухого вещества. Белки – основной компонент всех клеточных структур, основа жизни. В отличие от других органических соединений белки обладают рядом особенностей. Прежде всего, им присуща огромная молекулярная масса. Например, молекулярная масса альбумина составляет 36000, гемоглобина – 152000. Для сравнения: молекулярная масса этилового спирта – 46; уксусной кислоты – 60. Среди органических соединений белки самые сложные, они относятся к биологическим *полимерам*. Молекула полимера представляет собой длинную цепь, в которой много раз повторяется одна и та же, сравнительно простая структура – *мономер*. Если обозначить мономер буквой A, то структуру полимера можно изобразить следующим образом: A–A–A–A–A. Мономерами белков

являются аминокислоты. Молекула аминокислоты состоит из двух частей. Одна часть у всех аминокислот одинаковая – это группа $\text{H}-\text{C}-\text{NH}_2$. Она состоит из аминогруппы (NH_2) и находящейся рядом карбоксильной группы (COOH). Другая часть молекулы у всех аминокислот разная. Эта часть называется радикалом – R. Первая аминокислота была выделена из сока спаржи в 1806 г. С тех пор было получено более 150 аминокислот. Однако в качестве мономеров любых природных белков могут служить только двадцать из них. Их называют *белковыми* или *протеиногенными* (протеины (*греч*) – простые белки). Тот факт, что белки всех организмов построены из одних и тех же аминокислот, служит еще одним доказательством единства живого мира на Земле.

Первичная структура белка образуется в результате последовательного соединения аминогруппы одной кислоты и карбоксильной группы другой с выделением воды; за счет освободившихся валентных связей остатки аминокислот соединяются. Между аминокислотами возникает прочная ковалентная связь $\text{NH}-\text{CO}$, называемая *пептидной* связью:



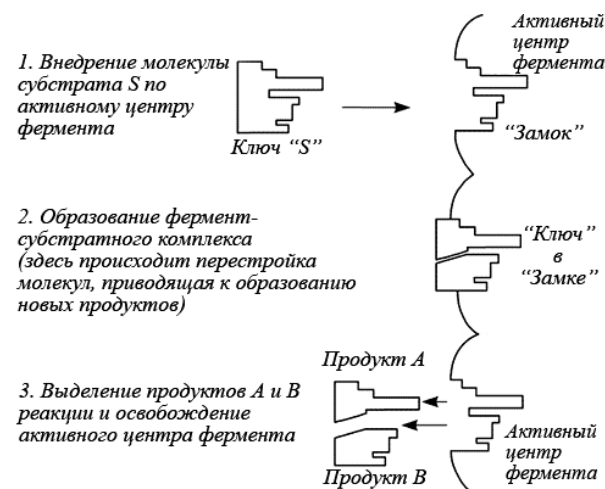
Образовавшееся соединение аминокислот называется *пептидом*. Пептид из двух аминокислот называется дипептидом, из трех аминокислот – трипептидом, из многих аминокислот – полипептидом. Белки представляют собой полипептиды, т.е. цепи из многих десятков и сотен аминокислотных звеньев:

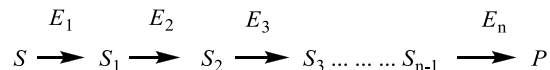
Каждому типу белка соответствует определенная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Эта последова-

ями и имеют высокую молекулярную массу, достигающую сотен тысяч и миллионов. На поверхности их гигантских молекул и протекают каталитические реакции.

В большинстве случаев ферменты катализируют превращения веществ, размеры молекул которых по сравнению с размерами макромолекулы фермента очень малы. Например, фермент каталаза имеет молекулярную массу 250 000, а пероксид водорода (H_2O_2), распад которого катализирует каталаза, всего 34.

Такое соотношение между размерами фермента и веществом, на которое он действует, показывает, что каталитическая активность фермента определяется не всей его молекулой, только небольшим ее участком – активным центром фермента. Как известно, реакция между веществами происходит при условии тесного сближения их молекул. Это сближение достигается благодаря геометрическому соответствию структур активного центра фермента и молекулы вещества. Они подходят друг к другу, как «ключ» к «замку». При денатурации фермента его каталитическая активность исчезает, так как нарушается структура активного центра. Механизм действия ферментов показан на рис. 1.12.





Примером «работы» такой мультиферментной системы является превращение глюкозы в спирт: чтобы произвести это превращение, дрожжевая клетка вырабатывает 12 ферментов.

Такая кооперативность и строгая последовательность в действии ферментов определяют их самое существенное отличие от катализаторов иной природы. Каждая клетка имеет регуляторные механизмы, позволяющие ей в зависимости от потребностей изменять скорость отдельных биохимических реакций в результате регуляции синтеза определенных ферментов или их активности. Способность подчиняться такой регуляции – крайне важная особенность ферментов как катализаторов.

Ферментативная реакция проходит через ряд последовательных стадий. В начальный момент фермент E образует с молекулой субстрата S промежуточное соединение – фермент-субстратный комплекс ES . На последующих стадиях фермент активизирует субстрат, т. е. изменяет его таким образом, что субстрат может вступить в соответствующую химическую реакцию. Этому моменту соответствует образование каталитически активного комплекса ES . Далее происходит собственно реакция на молекуле фермента, в результате которой получается фермент-продуктный комплекс EP . Процесс заканчивается выделением продукта реакции P и регенерацией фермента E :



Такой механизм действия ферментов подтвержден экспериментально. Каталитическая активность ферментов чрезвычайно высока. Химическая реакция разложения пероксида водорода катализируется ионами железа. В живой клетке под воздействием фермента каталазы, содержащего железо, эта реакция протекает в 10^{10} раз быстрее, чем с неорганическим катализатором.

1.4.2. Структура, механизм действия и свойства ферментов

По своей природе все ферменты являются белковыми соединениями.

Белочность является формулой белка и определяет его первичную структуру. Чаще всего полипептидная цепь закручивается в спираль. Это вторичная структура белка. При дальнейшей укладке спираль сворачивается в конфигурацию, определенную для каждого белка, образуя третичную структуру. Третичная структура не является высшей формой структурной организации белка. В живой клетке обнаружено много других, более сложных форм, например, четвертичные.

Под влиянием высокой температуры, экстремальных значений pH и других факторов могут разрушаться вторичная, третичная (но не первичная) структуры белка, и полипептидная цепь раскручивается. Такой процесс называется *денатурацией*. В результате денатурации свойства белка изменяются. Он утрачивает растворимость, становится доступным действию пищеварительных ферментов, теряет свою биологическую активность. Примером денатурации белков может служить превращение жидкого содержимого яйца после нагревания в плотную, непрозрачную массу. Процесс денатурации обратим, т.е. развернутая полипептидная связь способна самопроизвольно закрутиться в спираль, а спираль – самопроизвольно уложиться в третичную структуру. Это значит, что все особенности строения белка определяются его первичной структурой, т.е. составом и порядком чередования аминокислот в полипептидной цепи.

Нуклеиновые кислоты. На долю нуклеиновых кислот в клетках различных микроорганизмов приходится 5–30 % массы сухого вещества. Значение нуклеиновых кислот очень велико. Они обеспечивают хранение и передачу по наследству информации о структуре белковых молекул, которые синтезируются в каждой клетке. Белки же обуславливают большинство свойств и признаков клеток. Существуют два вида нуклеиновых кислот – дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК).

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Ей принадлежит роль хранителя наследственной информации во всех клетках. Молекула ДНК представляет собой две нити, спирально закрученные одна вокруг дру-

гой. Молекулярная масса ДНК исключительно велика – она достигает десятков и даже сотен миллионов. Каждая нить ДНК представляет собой полимер, мономерами которого являются *нуклеотиды*. Нуклеотид – это химическое соединение остатков трех веществ: азотистого основания, углевода (моносахарида – дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. ДНК всего органического мира образованы соединением четырех видов нуклеотидов. Нуклеотиды соединяются в строго определенной последовательности. Именно этой последовательностью определяется смысл генетической информации, которая передается от материнской клетки к дочерней. ДНК содержится в ядре клетки; она входит в состав хромосом, где находится в соединении с белками.

Рибонуклеиновая кислота (РНК). Структура РНК сходна со структурой ДНК. Она также является полинуклеотидом, но в отличие от ДНК, молекула РНК – одноцепочечная. Так же, как и ДНК, структура РНК создается чередованием четырех типов нуклеотидов, но состав нуклеотидов РНК несколько отличается от нуклеотидов ДНК, в частности, углевод РНК – не дезоксирибоза, а рибоза, отсюда название – рибонуклеиновая кислота.

В клетке имеется несколько видов РНК. Все они участвуют в синтезе белка. Первый вид – транспортные РНК (т-РНК). Они транспортируют аминокислоты к месту синтеза белка. Второй вид – информационные РНК (и-РНК или м-РНК от *англ. messenger-вестник*). Их функция состоит в переносе информации о структуре белка (т.е. о последовательности расположения аминокислот в молекуле белка) от ДНК к месту синтеза белка. Третий вид – рибосомные РНК (р-РНК) – входят в состав рибосом и участвуют в процессах синтеза белка.

Передача генетической информации. Биосинтез белков. В клетке содержится несколько тысяч разных белков, причем каждая клетка имеет специфические белки, присущие только данному виду клеток. Способность синтезировать именно свои белки передается по наследству от клетки к клетке и сохраняется в течение всей жизни. Все клетки в течение жизни синтезируют белки, так как в ходе нормальной жизнедеятельности

особенностей ферментативного катализа – строгая специфичность их действия. Под специфичностью понимают способность фермента реагировать только с одним веществом (абсолютная специфичность); с группой веществ, обладающих общими структурными признаками (групповая специфичность); действовать на определенную химическую связь (относительная специфичность).

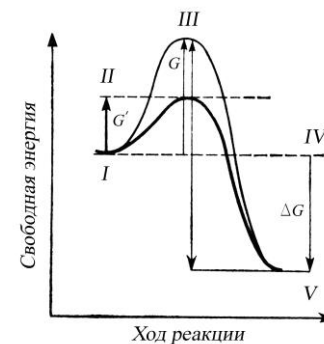


Рисунок 1.11 – Энергетическая схема некатализируемой и катализируемой реакций:

I – начальное состояние; II – свободная энергия активации катализируемой реакции; III – то же, некатализируемой реакции; IV – полное изменение свободной энергии в ходе реакции; V – конечное состояние

Многие ферменты образуют в клетке так называемые мультиферментные системы. Процесс превращения вещества с участием системы ферментов представляет собой серию последовательных реакций, каждую из которых катализирует определенный фермент. При этом продукт первой реакции служит субстратом для второй, продукт второй реакции – субстратом для третьей и т. д. Превращение субстрата *S* в продукт *P* в простейшей мультиферментной системе ($E_1 - E_n$) иллюстрируется следующей схемой:

цевым песком, до тех пор, пока под микроскопом нельзя было обнаружить ни одной целой дрожжевой клетки. Затем он отфильтровал полученную суспензию и получил прозрачную жидкость, к которой добавил раствор глюкозы. Через некоторое время в жидкости появились пузырьки газа – диоксида углерода, т.е. брожение все-таки происходило. Это означало, что брожение вызывается не самими клетками дрожжей, а содержащимися в них веществами, которые были названы *энзимами* (от греч. *en zyme* – в дрожжах), или *ферментами*.

Катализаторами называются вещества, которые, участвуя в реакции, изменяют ее скорость, но сами к концу реакции остаются химически неизменными. Химическое взаимодействие молекул происходит только в результате их столкновения при условии, что в этот момент они обладают некоторым избытком свободной энергии G , достаточным для их перехода в активированное (переходное) состояние. Скорость реакции пропорциональна концентрации активированных молекул. Сущность действия катализатора состоит в том, что он, связывая реагирующие вещества, приводит к появлению нового переходного состояния, для которого свободная энергия активации G существенно ниже, чем в некатализируемой реакции. Следует отметить, что введение катализатора не отражается на суммарном энергетическом эффекте реакции ΔG и не изменяет состояния равновесия в реагирующей системе (рис.1.11).

Катализ называют *гомогенным*, если катализатор и реагирующие вещества находятся в одной фазе, и *гетерогенным*, если они образуют две фазы.

Ферментативный катализ обычно рассматривают как катализ гетерогенный, происходящий на поверхности гигантских белковых молекул ферментов.

Подчиняясь общим закономерностям каталитических процессов, ферментативный катализ имеет ряд существенных отличий от химического. Прежде всего, ферментативный катализ протекает в живой клетке в ограниченном диапазоне температур, значений pH и давления.

В большинстве случаев условия, в которых ферменты осуществляют катализ, оказываются достаточно «мягкими». Одна из важнейших

тельности белки постепенно денатурируются, их структура и функции нарушаются. Такие молекулы белков удаляются из клетки и заменяются новыми полноценными молекулами. Благодаря этому жизнедеятельность клетки сохраняется.

Код ДНК. Информация о первичной структуре белков данной клетки заключена в ДНК. Отрезок молекулы ДНК, содержащий информацию о первичной структуре одного определенного белка, называется *геном*. В молекуле ДНК содержится несколько сотен генов, отражающих структуру всех белков, синтезируемых данной клеткой.

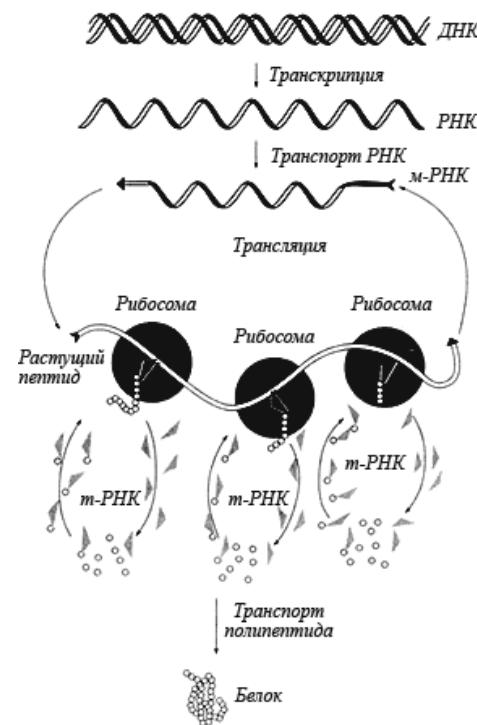


Рисунок 1.10 – Общая схема биосинтеза белка

Синтез белка протекает на рибосомах. К ним информация о структуре белка, зашифрованная в ДНК, передается с помощью и-РНК,

которые синтезируются на одной из цепей участка молекулы ДНК – гена – и в точности повторяют его структуру. Таким путем информация, содержащаяся в гене, как бы переписывается на и-РНК. Этот процесс называется *транскрипцией*. Длина и-РНК равна длине гена. Затем молекулы и-РНК направляются к месту синтеза белка, т.е. к рибосомам и прикрепляются к ним. Туда же из цитоплазмы с помощью т-РНК доставляются те аминокислоты, из которых необходимо построить белок.

Рибосомы «прокатываются» вдоль и-РНК, считывая код и соединяя аминокислоты в нужной последовательности, образуя соответствующий белок. Общая схема биосинтеза белка представлена на рис. 1.10.

Липиды. Липиды (жиры и жироподобные вещества) – органические соединения, не растворимые в воде, но растворимые в органических неполярных растворителях, таких, как эфир, бензол, хлороформ. Липиды в клетках большинства микроорганизмов составляют 2–15 % сухой массы. Лишь у кислотоустойчивых бактерий и у некоторых видов грибов и дрожжей количество жиров может достигать 40 %. В связанном состоянии жиры находятся в цитоплазматической мембране. В свободном состоянии жиры играют роль запасных веществ и служат источниками энергии. В ходе расщепления жира освобождается в два раза больше энергии, чем при расщеплении углеводов. Истинные жиры представляют собой сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот.

Важнейшими жироподобными веществами являются фосфо- и гликолипиды. Фосфолипиды, или глицерофосфаты, обладающие большой физиологической активностью, отличаются от истинных жиров тем, что один из остатков жирных кислот заменен в них фосфорной кислотой, соединенной эфирной связью с каким-либо спиртом. Гликолипиды содержат в своем составе углеводы. К числу неомыляемых жиров, содержащихся в клетках микроорганизмов, относятся стероиды, жирорастворимые витамины и некоторые пигменты, например каротиноиды.

Углеводы. В клетках бактерий на долю углеводов приходится 12–

30 % сухого вещества, в клетках грибов – до 40–60 %. Углеводы принимают участие в синтезе белков и жиров, входят в состав структурных компонентов клетки, служат источником энергии в клетке.

Эмпирическая формула углеводов $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Углеводы делятся на простые сахара, олигосахариды и полисахариды. Из простых сахаров наибольшее значение для живых организмов имеют гексозы (в частности, глюкоза) и пентозы (например, рибоза и дезоксирибоза). Среди олигосахаридов наиболее важны дисахариды (состоящие из двух молекул простых сахаров): сахароза, мальтоза, лактоза.

Большинство углеводов, встречающихся в природе, существует в форме высокомолекулярных полисахаридов. По химическому составу полисахариды подразделяют на пентозаны (мономер пентоза), гексозаны (мономер гексоза) и смешанные полисахариды, имеющие в своем составе различные сахара. К пентозанам относятся гемицеллюлозы; к гексозанам – декстрины, состоящие из остатков глюкозы и часто встречающиеся в клетках дрожжей и бактерий, а также целлюлоза, крахмал и гликоген. Полисахариды входят в состав капсул бактерий и выделяются микроорганизмами в виде слизи. К числу основных резервных полисахаридов относятся крахмал, гликоген и декстрины.

1.4. Ферменты

1.4.1. Природа ферментов и особенности ферментативного катализа

Ферменты, или энзимы, составляют самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Ферменты синтезируются самой клеткой и выполняют в ней функции катализаторов биохимических реакций.

Историческая справка. Ферменты были открыты в 1897 г. великим немецким химиком Эдуардом Бухнером. В то время уже было известно, что процесс брожения, в результате которого глюкоза превращается в спирт и диоксид углерода, происходит только в присутствии клеток дрожжей. Бухнер решил выяснить, возможно ли брожение при отсутствии *живых* клеток дрожжей. Для этого он провел эксперимент: растирал клетки дрожжей, перемешанные с квар-

ментах и энергии. Основные химические элементы, необходимые для всех без исключения микроорганизмов и потребляемые в относительно больших количествах – углерод, азот, кислород и водород. Кроме того, микроорганизмы нуждаются в фосфоре, калии, сере, натрии, магнии и других элементах.

Указанные элементы могут присутствовать в питательной среде в различных формах и соединениях.

Роль источников углерода, азота и фосфора в процессах микробиологического синтеза является первостепенной. От остальных компонентов минеральной питательной среды эти вещества отличает сравнительно высокая скорость их потребления микроорганизмами и необходимость поддержания в среде высоких «фоновых» концентраций.

Особенностью процессов микробиологического синтеза является зависимость стехиометрических коэффициентов потребления основных питательных веществ от физиологической активности клеток. При расчете этих коэффициентов общие затраты питательных веществ (субстрата) можно разделить на затраты, связанные с процессами построения биомассы, и на затраты, связанные с процессами метаболизма микроорганизмов.

Затраты субстрата на прирост биомассы:

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_1^S \frac{dX}{dt} . \quad (2.10)$$

Затраты субстрата на основной обмен (метаболизм):

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_2^S X . \quad (2.11)$$

Тогда общие затраты субстрата на процесс микробного синтеза будут равны сумме указанных затрат:

$$\frac{dS}{dt} = \alpha_1^S \frac{dX}{dt} + \alpha_2^S X , \quad (2.12)$$

где S , X – концентрация субстрата и биомассы; $\frac{dS}{dt}$; $\frac{dX}{dt}$ – скорость потребления субстрата и роста биомассы соответственно.



Этот процесс лежит в основе производства этилового спирта.

Облигатные анаэробы не переносят даже ничтожных количеств кислорода в среде и быстро погибают. Это связано с тем, что при растворении кислорода в питательных средах, содержащих, как правило, молекулярный водород, происходит образование пероксида водорода (H_2O_2), являющегося сильнейшим ядом для этих микроорганизмов. Для аэробных микроорганизмов образование пероксида водорода не опасно, так как они способны вырабатывать фермент каталазу, разлагающий H_2O_2 на нейтральные соединения – воду и молекулярный кислород:



Анаэробные микроорганизмы такой способностью не обладают.

1.6. Взаимосвязь микроорганизмов и окружающей среды

Жизнь микроорганизмов неразрывно связана с окружающей средой. С одной стороны, деятельность микробов значительно изменяет окружающую среду в результате удаления из нее питательных веществ и выделения продуктов обмена; с другой стороны, интенсивность обменных процессов внутри клетки во многом зависит от условий окружающей среды.

Факторы окружающей среды, влияющие на жизнедеятельность микроорганизмов, подразделяют на *абиотические* (физические и химические) и *биотические* (связанные с влиянием со стороны других живых организмов). Однако многие такие факторы тесно взаимосвязаны, так что изменение одного из них часто изменяет реакцию организма на действие других факторов.

1.6.1. Абиотические факторы внешней среды

1.6.1.1. Влияние физических факторов внешней среды на микроорганизмы. К важнейшим физическим факторам, обуславливающим активность микроорганизмов, относятся температура и свет.

Температура. Активная жизнедеятельность микроорганизмов

ограничивается температурами, лежащими в области от -2°C (или ниже в средах с высоким осмотическим давлением) и примерно до $+80^{\circ}\text{C}$. В этом температурном интервале вода находится в капельно-жидком состоянии, т. е. в доступной для микроорганизмов форме. Рост каждого вида микроорганизмов может происходить в определенном температурном интервале, ограниченном минимальной и максимальной для данного вида температурами.

Минимальная – это температура, при которой микроорганизмы не растут, но и не гибнут; при температуре ниже минимальной микробы переходят в состояние *анабиоза* (состояние крайнего замедления процессов жизнедеятельности), из которого снова выходят при повышении температуры.

Максимальная – это самая высокая температура, при которой еще возможен рост и развитие микроорганизмов; при дальнейшем повышении температуры микробы гибнут из-за коагуляции белков.

Оптимальная – наиболее благоприятная температура для жизнедеятельности микробов в этом интервале. Это температура максимальной активности ферментов, при которой наиболее полно проявляются все функции микроорганизмов. Для каждого микроорганизма оптимальная температура определяется суммарным влиянием температуры на множество ферментативных реакций, происходящих в клетке этого микроорганизма.

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на три группы:

1) *Психрофилы* или холодолюбивые (от греч. *psychria* – холод, *phileo* – люблю). Среди них есть облигатные формы, растущие в диапазоне температур от -2 до 20°C с оптимумом $5-15^{\circ}\text{C}$, и факультативные психрофилы, развивающиеся в более широком температурном интервале – от минусовых температур до $30-35^{\circ}\text{C}$. Для них оптимальной является температура $20-25^{\circ}\text{C}$. Способность психрофилов интенсивно развиваться при низких температурах объясняется низким температурным оптимумом действия их ферментов. Живут такие микробы в северных

сливают содержимое ферментатора и выделяют целевой продукт.

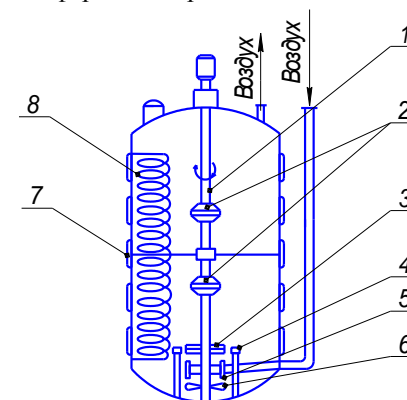


Рисунок 2.1 – Устройство ферментатора:

1 – вал; 2, 3, 6 – мешалки; 4 – статор; 5 – барботер, 7 – рубашка, 8 – змеевик

При непрерывном способе глубинного культивирования питательная среда непрерывно подается в ферментатор, в котором создают оптимальные условия для роста микроорганизмов, а из ферментатора также непрерывно вытекает культуральная жидкость вместе с микроорганизмами.

Ясно, что условия для роста микроорганизмов при периодическом и непрерывном процессе существенно различаются. При периодическом процессе концентрация питательных веществ в среде с течением времени уменьшается, а содержание продуктов метаболизма увеличивается, что неблагоприятно влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. При непрерывном процессе эти два показателя поддерживают на постоянном уровне, что создает наиболее благоприятные условия для роста микроорганизмов.

На рост и размножение микроорганизмов существенное влияние оказывают состав и качество питательной среды. Питательные среды, используемые для культивирования микроорганизмов, должны содержать вещества, удовлетворяющие их потребности в структурных эле-

тие микроорганизмов. Сыпучие субстраты равномерно распределяют слоем в специальные кюветы, которые после засева посевного материала помещают в растительные камеры. Выращивание микроорганизмов при оптимальных условиях продолжается в течение нескольких дней. После завершения процесса выращивания микроорганизмов выделяют конечный продукт. Процесс выращивания микроорганизмов поверхностным способом заканчивается за определенный период времени и поэтому является периодическим.

Выращивание микроорганизмов *глубинным способом* происходит во всем объеме жидкой питательной среды в специальном аппарате – *ферментаторе* (рис 2.1). Выращивание микроорганизмов глубинным способом может быть периодическим и непрерывным (проточным).

При периодическом способе глубинного культивирования в ферментатор загружают сразу весь объем питательной среды и вносят посевной материал. Смесь питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*. Так как микроорганизмы могут утилизировать только растворенный в воде кислород, а растворимость кислорода в воде невелика, то для обеспечения роста аэробных микроорганизмов их необходимо снабжать кислородом. Процесс подвода кислорода вглубь жидкой среды называется аэрированием. Аэрирование осуществляется продуванием стерильного воздуха через культуральную жидкость. Для интенсификации процесса растворения воздуха его пропускают через *барботеры*, расположенные на днище реактора.

Принудительную аэрацию в ферментаторах обычно совмещают с перемешиванием среды с помощью мешалок. Это обеспечивает максимальный контакт клеток с кислородом воздуха, питательными веществами, резко увеличивает поверхность соприкосновения клеток и позволяет поддерживать максимальную скорость вывода метаболитов из клеток.

Выращивание микроорганизмов проводят в оптимальных условиях в течение определенного времени, после чего процесс останавливают,

морях (морские бактерии), в почвах холодных стран, в холодильных установках.

2) *Термофилы* – теплолюбивые микроорганизмы (от греч. *therme* – тепло). Температурный диапазон развития облигатных термофилов от 30 до 80 °С с оптимумом 50–60 °С. Факультативные термофилы способны к росту и при 25 °С, и при 60–65 °С. Для них оптимальная температура около 55 °С. Особенность факультативных термофилов заключается в их способности к метаболизму мезофильного и термофильного типов. Эндо- и экзоферменты, а также все белки термофилов обладают необычной термоустойчивостью. Термофилы довольно широко распространены в природе. Они могут обитать в горячих источниках, в почвах и водоемах жарких стран, в кишечнике человека и животных. Термофилы встречаются в продуктах, прошедших тепловую обработку (в консервном, сахарном и др. производствах). К термофилам и психрофилам относятся в основном бактерии.

3) *Мезофилы* (от греч. *mesos* – средний). Эти микроорганизмы развиваются в интервале температур от 10 до 50 °С. Оптимальная температура для них 25–37 °С. К мезофильным микроорганизмам относится большинство бактерий, простейших, грибов. В эту же группу включены и все патогенные для человека и теплокровных животных организмы. Возбудителями порчи пищевых продуктов, пищевых отравлений и заболеваний в основном являются мезофилы.

Способность развиваться при определенной температуре следует отличать от способности переносить ту или иную температуру. Так, многие микроорганизмы при температуре ниже нуля сохраняют жизнеспособность длительное время, но их активная жизнедеятельность приостанавливается. Споры многих бактерий не погибают даже при температуре кипения жидкого водорода (–252 °С).

Значительно менее устойчивы микроорганизмы к действию высоких температур. Большинство бактерий погибает при температуре 70 °С в течение 10–15 мин, при 100 °С – в течение 1 мин. Дрожжи и грибы погибают уже при 50–60 °С. Более устойчивыми к нагреванию являются

термофилы, обладающие повышенной термоустойчивостью.

Термоустойчивость – это способность микроорганизмов выдерживать длительное нагревание при температурах, превышающих температурный максимум их развития. Споры микроорганизмов более термоустойчивы, чем целые клетки. Например, споры бактерий во влажной среде гибнут при 120–130 °С через 20–30 мин., а в сухом состоянии – при 160–170 °С – через 1 – 2 ч. Споры большинства дрожжей и грибов погибают довольно быстро – при 65–80 °С.

Губительное действие высоких температур связано с денатурацией белков. На температуру денатурации белка сильно влияет содержание в нем воды. Чем меньше воды в белке, тем более высокие температуры необходимы для его свертывания. Поэтому молодые вегетативные клетки, богатые свободной водой, погибают при нагревании быстрее, чем старые, частично обезвоженные. Высокая термоустойчивость спор также обусловлена малым содержанием в них свободной воды, так как большая часть воды находится в спорах в связанном состоянии. Предхраняют споры и многослойная труднопроницаемая оболочка.

На губительном действии высоких температур основаны различные методы уничтожения микроорганизмов в пищевых продуктах. Это кипячение, варка, бланширование, обжарка, а также пастеризация и стерилизация.

Пастеризация или частичная стерилизация – это процесс уничтожения клеток бактерий путем нагревания: до 50 – 60 °С в течение 15–30 мин или до 70–80 °С в течение 5–10 мин. При пастеризации споры бактерий и некоторые термофильные бактерии не погибают. Пастеризацию применяют для сохранения молока, пива, вина, икры осетровых рыб, фруктовых соков.

Стерилизация – это процесс полного уничтожения микроорганизмов, в том числе и спорообразующих, под действием высоких температур. Стерилизация бывает двух видов – влажная и сухая. Влажная стерилизация осуществляется насыщенным водяным паром под давлением 0,05–0,1 МПа в специальных приборах – автоклавах – в течение

$\Delta S \rightarrow 0$.

Поскольку биомасса X возрастает, а концентрация субстрата S уменьшается, вводится знак « – ». Значение Y изменяется в широких пределах в зависимости от природы субстрата, видов микроорганизмов и условий окружающей среды.

Питательные вещества, потребляемые клеткой, помимо конструктивного обмена, расходуются и для энергетических целей. С учетом расхода питательных веществ на метаболизм в целом скорость потребления субстрата можно выразить следующим образом: $dS/dt = qX$, где q – метаболический коэффициент, или удельная скорость метаболизма (физиологическая активность).

Величины μ, Y, q связаны между собой следующим отношением:

$$q = \mu / Y. \quad (2.9)$$

Выражение (2.9) используют для определения потребности в субстрате при разных скоростях роста.

2.2. Способы культивирования микроорганизмов

Для выращивания (культивирования) микроорганизмов применяют два способа – поверхностный и глубинный, которые реализуются преимущественно в аэробных условиях. Выбор способа зависит от конечной цели культивирования: это либо накопление биомассы, либо получение определенного продукта жизнедеятельности микроорганизма (метаболита).

Технология выращивания микроорганизмов *поверхностным способом* довольно проста. Она заключается в том, что микроорганизмы культивируют на поверхности твердых или жидких питательных сред. В качестве твердых питательных сред используют агаризованные среды или сыпучие субстраты (пшено, ячмень, пшеничные отруби и т. п.). Агаризованные питательные среды стерильно разливают по пробиркам, чашкам Петри, стеклянным флаконам. После засева культуры на стерильную питательную среду пробирки или чашки Петри помещают в термостат, где при определенной температуре происходит рост и разви-

Общая скорость роста биомассы V_+ пропорциональна ее количеству:

$$V_+ = \frac{dX}{dt}, \quad (2.2)$$

где dX – прирост биомассы X за бесконечно малый промежуток времени dt .

Удельная скорость роста выражает прирост единицы биомассы популяции в единицу времени:

$$V_+ = \mu X, \quad (2.3)$$

$$\mu = \frac{V_+}{X} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}. \quad (2.4)$$

Здесь μ – удельная скорость роста, имеет размерность t^{-1} . Величина μ – основной параметр, характеризующий рост.

Общая скорость отмирания особей равна отношению снижения биомассы популяции ко времени, за которое произошло это снижение:

$$V_- = -\frac{dX}{dt}. \quad (2.5)$$

Удельная скорость отмирания ε выражает снижение каждой единицы биомассы популяции в единицу времени:

$$\varepsilon = \frac{V_-}{X} = -\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}, \quad (2.6)$$

где ε имеет размерность t^{-1} .

Биомасса, продуцируемая в пересчете на единицу потребленного субстрата S , называется *экономическим коэффициентом* Y или коэффициентом прироста биомассы:

$$Y = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S} \quad (2.7)$$

или, более строго:

$$Y = -\frac{dX}{dS}, \quad (2.8)$$

так как Y – предел, к которому стремится отношение $\frac{\Delta X}{\Delta S}$ при

20–60 мин при температуре 112–120 °С. Сухую стерилизацию проводят в сушильных шкафах сухим горячим воздухом течение 1,5–2 ч при температуре 160–170 °С. Более высокий стерилизующий эффект водяного пара по сравнению с сухим воздухом объясняется тем, что пар не только нагревает, но и дополнительно увлажняет клетки и споры, что приводит к снижению их термоустойчивости. Практическая реализация термической стерилизации зависит от стерилизуемого объекта. Так, пустые аппараты, коммуникации, питательные среды чаще всего стерилизуют насыщенным водяным паром. Сухой горячий воздух используют для стерилизации материалов, которые могут быть испорчены при обработке паром (безводные жиры, масла, порошки и т.п.).

Свет. Большинство микроорганизмов хорошо растет в темноте. Исключение составляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие энергию Солнца для синтеза органических веществ из CO_2 . Прямой солнечный свет губителен для микроорганизмов. *Микробоцидное* (убивающее) его действие обусловлено главным образом ультрафиолетовой (УФ) частью спектра. Адсорбция ультрафиолетовых лучей белками и нуклеиновыми кислотами клетки приводит к необратимым химическим изменениям. Наиболее чувствительны к действию света вегетативные клетки. Губительны ультрафиолетовые лучи и для большинства патогенных микробов. Однако есть микроорганизмы, выдерживающие высокие дозы ультрафиолетового и ионизирующего излучения. Они выделены на атомных реакторах.

Облучение ультрафиолетовыми лучами применяют для обеззараживания воздуха в производственных помещениях, в холодильных камерах, для обеззараживания производственного оборудования, упаковочных материалов, тары. Однако применение УФ-облучения с целью стерилизации пищевых продуктов ограничено вследствие их невысокой проникающей способности, позволяющей обеспложивать только поверхность продуктов (например, поверхность упакованного хлеба), а у таких продуктов, как сливочное масло и молоко, при УФ-облучении ухудшаются вкусовые качества и питательные свойства. УФ-лучи

успешно применяются для дезинфекции питьевой воды.

1.6.1.2. Влияние химических факторов внешней среды на микроорганизмы. Жизнедеятельность микроорганизмов и интенсивность обменных процессов зависят и от химического состава среды обитания. К важнейшим химическим факторам относятся pH, суммарная концентрация органических и неорганических веществ, наличие токсичных соединений.

Концентрация водородных ионов (pH) существенно влияет на развитие микроорганизмов. Большинство бактерий предпочитает среду со значением pH, близким к нейтральному (6,5–7,5). Однако некоторые виды бактерий хорошо растут в щелочной или более кислой среде. Споры бактерий более устойчивы к изменениям pH, чем вегетативные клетки. У большинства эукариот (грибы и дрожжи) оптимальное значение pH 4–6. Минимум pH для дрожжей составляет 3, для грибов – 1,5; максимум для дрожжей – 8,5, для грибов – 10, т.е. грибы могут развиваться в более широком диапазоне значений pH, чем дрожжи.

Если pH не соответствует оптимальной величине, то микроорганизмы не могут нормально развиваться даже при наличии всех необходимых питательных веществ, так как pH оказывает большое влияние на активность ферментов клетки и проницаемость ее стенок.

Для бактерий кислая среда более опасна, чем щелочная. Особенно неблагоприятна кислая среда для развития гнилостных бактерий, оптимальное значение pH которых лежит в слабощелочной области 7,5–7,7. Это обстоятельство используется при консервировании продуктов путем маринования или квашения. При мариновании к продукту добавляют уксусную кислоту, при квашении создают условия для развития молочнокислых бактерий, образующих кислоту и тем самым препятствующих развитию гнилостных бактерий.

Токсичные соединения. Многие химические соединения обладают антимикробным действием; при этом одни только задерживают развитие микробов (*микробостатическое действие*), другие – обладают *микробоцидными* (вызывают гибель микробов) свойствами. Такие соедине-

ния осуществляются гетерогенными культурами.

Величина популяции выражается численностью особей или суммарной биомассой отдельных особей.

Численность особей в популяции в лабораторном или промышленном ферментаторе можно определить прямым подсчетом в определенном объеме под микроскопом или по числу колоний в чашке Петри с последующим пересчетом на рабочий объем ферментатора.

Биомассу популяции в ферментаторе можно определить взвешиванием биомассы клеток, выделенной путем фильтрации или центрифугирования из единицы объема микробной суспензии, с последующим пересчетом на рабочий объем ферментатора.

Плотность популяции характеризуется количеством особей в единице объема (млн/см³, млрд/см³) или концентрацией биомассы особей в единице объема (г/л, кг/м³).

Рост клеток характеризуется несколькими параметрами, из которых важнейшие – скорость роста, физиологическая активность и экономический коэффициент.

Каждая популяция увеличивает или уменьшает свою плотность (биомассу) с определенной скоростью. Различают общие скорости роста V_+ и отмирания V_- и относительные (удельные) скорости роста μ и отмирания ϵ .

При периодическом культивировании скорость роста популяции непостоянна, и чаще определяется средняя скорость роста V_{+cp} .

Обозначим биомассу через X , время роста клеток – через t . Концентрацию биомассы в начальный момент времени размножения клеток t_0 обозначим как X_0 , концентрацию биомассы через промежуток времени t_1 – как X_1 . Средняя скорость роста клеток определится как

$$V_{+cp} = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \quad (2.1)$$

где $X_1 - X_0$ – прирост биомассы, (г), определяемый экспериментально;

$t_1 - t_0$ – время прироста биомассы с X_0 до X_1 , (мин)

ведите примеры биотических взаимодействий микроорганизмов.

ГЛАВА 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Общие представления о росте и развитии

микроорганизмов

Процессы промышленной биотехнологии разделяют на две большие группы по признаку целевого продукта:

- производство биомассы микроорганизмов (например, пищевых дрожжей);
- получение продуктов метаболизма клеток (продуктов брожения, ферментов и т.д.).

Независимо от конечного вида целевого продукта в процессе производства необходимо накопить определенную массу клеток микроорганизмов. Это достигается в результате роста клеток, когда в результате обмена веществ сначала увеличиваются биомасса и размеры клеток до определенных размеров, а затем происходит их размножение. Таким образом, под *ростом культуры микроорганизмов* обычно подразумевают не только рост отдельной клетки, но и увеличение общего количества клеток в результате размножения.

Процесс роста клеток подчиняется определенным закономерностям, которые изучает *биокинетика* – важнейший раздел микробиологии. Биокинетика является научной базой управляемого количественного биосинтеза.

Основные термины и определения биокинетики.

При изучении свойств микроорганизмов из-за их малых размеров и массы обычно имеют дело не с одной, а с большим количеством особей. Таким образом, учитываются свойства не отдельных клеток, а определенного их количества.

Совокупность особей *определенного вида* микроорганизмов называется *чистой культурой*, или *популяцией*. Культура, в которой содержится более чем один вид микробов, называется *смешанной*, или *гетерогенной*. Все природные микробиальные явления и биологические про-

ния обычно называют ядами. Однако абсолютных ядов не существует, и степень их воздействия на микроорганизмы зависит от концентрации, продолжительности контакта и вида микробов. Многие яды в очень малых концентрациях оказывают даже стимулирующее действие, повышая биохимическую активность микроорганизмов. Среди неорганических веществ микробоцидным эффектом обладают соли тяжелых металлов и такие окислители, как хлор, озон, бром, йод. Соединения серебра, ртути и меди даже в ничтожно малых концентрациях проявляют микробоцидное действие. Среди токсичных металлов есть металлы, необходимые для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов. Например, медь при концентрации более 0,5 мг/л токсична для большинства микроорганизмов, но как микроэлемент необходима им. Кобальт и железо – также постоянные компоненты живой материи, но концентрация кобальта более 1 мг/л считается токсичной.

Микробные яды используют для обеззараживания различных материалов, подавления нежелательных биохимических процессов. Микробоцидное действие сильных окислителей (хлорной извести, озона) лежит в основе широко применяемых методов обеззараживания питьевых и сточных вод (хлорирование, озонирование).

Сильными ядами для микробов являются и некоторые органические соединения: фенолы, спирты, формалин и т. д. Механизм действия антимикробных соединений неодинаков: одни (окислители, фенолы, ПАВ, ионы водорода) влияют на функцию пограничных структур клетки, вызывая ее повреждение; другие (тяжелые металлы, цианиды, некоторые окислители, спирты) нарушают структуру и функции белков, в том числе ферментов; третьи, проникая в клетку, способны реагировать с ДНК (азотистая кислота, некоторые антибиотики, окись этилена).

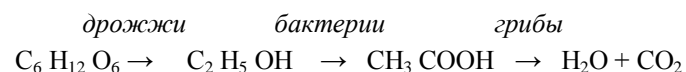
1.6.2. Биотические факторы внешней среды

Различные виды организмов образуют сложные сообщества — *биоценозы*, представляющие собой не случайное скопление организмов, а организованную систему. Состав и характер биоценоза определяются

свойствами окружающей среды и взаимоотношениями, существующими между представителями отдельных видов. Типы взаимоотношений между микроорганизмами многообразны.

Симбиотические отношения приносят взаимную выгоду симбионтам. Совместный рост таких организмов идет лучше, чем по отдельности. Широко распространенный пример симбиотических взаимоотношений — симбиоз зеленых водорослей и инфузорий. Водоросль, поселяясь внутри тела инфузории, использует энергию света для превращения CO_2 в органические вещества, выделяя при этом кислород. Инфузория потребляет кислород для окисления органических веществ в процессе дыхания, образуя в итоге CO_2 .

Широко распространен *метабиоз* — тип взаимоотношений, при котором жизнедеятельность одних микроорганизмов создает условия для развития других. Метабиоз обуславливает последовательность превращений одних веществ в другие и лежит в основе круговорота веществ в природе. Примером таких взаимоотношений может служить процесс порчи сахаросодержащих субстратов (соков, плодов, ягод): сначала на них начинают развиваться дрожжи, превращающие сахар в спирт, затем спирт под действием уксуснокислых бактерий превращается в уксусную кислоту, и наконец, мицелиальные грибы окисляют уксусную кислоту до воды и диоксида углерода.



Среди микроорганизмов широко распространены *антагонистические* (враждебные) взаимоотношения. К ним относятся:

- 1) *хищничество* (пожирание бактерий простейшими);
- 2) *паразитизм* (уничтожение бактерий бактериофагами);
- 3) *конкуренция за источники питания* (при совместном обитании двух родственных видов в борьбе за пищу побеждает тот вид, который быстрее размножается);

4) *выделение в среду метаболитов*, снижающих жизнедеятельность других организмов или убивающих их. Так, продукт метаболизма гриба *Penicillium* — пенициллин — является антибиотиком, обладающим бактерицидным действием и препятствующим развитию гнилостных бактерий.

Пространство, занимаемое биоценозом, называется *биотопом*. Биоценоз и биотоп неразрывно связаны, воздействуют друг на друга и образуют экологическую систему (*экосистему*). Примеры природных экосистем — различные водоемы или их участки. К числу искусственных экосистем могут быть отнесены все сооружения биологической очистки сточных вод.

Любая экосистема является открытой системой, для которой характерен постоянный обмен веществ и энергии как вне, так и внутри нее. Природные экосистемы способны к саморегуляции и до некоторой степени могут противостоять изменениям окружающей среды. Тем не менее, условия среды существенно влияют на формирование экосистем и интенсивность обменных процессов внутри биоценоза.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. Укажите положение микроорганизмов в системе живого мира и принципы их систематики.
2. Назовите основные внутриклеточные структуры эукариот и прокариот. Каковы их функции?
3. Назовите основные молекулярные компоненты клетки и их роль в жизнедеятельности микроорганизмов.
4. Какова функция ферментов в клетке?
5. Какие типы обмена веществ существуют у микроорганизмов?
6. На какие группы делятся микроорганизмы по отношению к температуре?
7. Как влияет pH питательной среды на жизнедеятельность микроорганизмов?
8. Какие факторы внешней среды относятся к биотическим? При-

Общим свойством подавляющего большинства продуктов микробиологического синтеза является их недостаточная стойкость к хранению, поскольку сами эти продукты склонны к разложению и представляют благоприятную среду для развития посторонней, чаще всего гнилостной микрофлоры. Это требует принятия специальных мер для повышения сохранности продукции промышленной биотехнологии.

Ниже приводится обобщенная характеристика каждой из стадий промышленного микробиологического синтеза, внутренняя взаимосвязь которых делает каждое конкретное производство единым целым.

3.1. Технология приготовления питательных сред для выращивания микроорганизмов

3.1.1. Питание микроорганизмов

Отношение микроорганизмов к источникам питания. В основе жизнедеятельности микроорганизмов лежит обмен веществ, связанный с поступлением питательных веществ в клетку и выделением из нее продуктов жизнедеятельности. Питательные вещества в микробной клетке непрерывно подвергаются превращениям, которые приводят к росту и размножению клетки. Специфичность микроорганизмов особенно проявляется в их отношении к источникам углерода и азота. По этому признаку они условно делятся на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *auto* – сам, *trophe* – пища) способны получать углерод из диоксида углерода и карбонатов. К автотрофам, представляющим интерес для микробиологической промышленности как источникам для получения пищевого и кормового белков, относятся бактерии и некоторые виды водорослей.

Гетеротрофы (от греч. *heteros* – другой) усваивают в основном углерод органических соединений, например, углеводов, парафинов, спиртов и др. Большинство микроорганизмов, используемых в микробиологической промышленности, относится к гетеротрофам. Среди них большую группу составляют *сапрофиты*, питающиеся продуктами жизнедеятельности других организмов или отмершими растительными и

Введем обозначения $\alpha_1^S = a$; $\alpha_2^S = b$ и преобразуем выражение (2.12):

$$\frac{dS}{dt} = \left[a \frac{dX}{dt} + bX \right]; \quad (2.13)$$

разделив обе части уравнения на $\frac{dX}{dt}$, получим:

$$\frac{dS}{dX} = a + b \frac{Xdt}{dX},$$

где $\frac{dS}{dX} = \alpha^S$ – стехиометрический коэффициент преобразования

субстрата в биомассу; откуда

$$\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}. \quad (2.14)$$

Формула (2.14) позволяет рассчитать удельный расход субстрата, отдельных компонентов субстрата и продуктов метаболизма в процессе биосинтеза клеточной массы.

Пример. Рассчитать удельный расход субстрата, кислорода, выделение углекислого газа, метаболической воды и тепла в процессе непрерывного выращивания дрожжей на *n*-парафинах при удельной скорости роста $\mu = 0,18 \text{ ч}^{-1}$.

Средние значения коэффициентов a и b для расчета стехиометрических соотношений α^{O_2} , α^S , α^{CO_2} , $\alpha^{\text{H}_2\text{O}}$ при выращивании дрожжей на *n*-парафинах составляют:

для углеводов: $a = 0,85 \text{ кг/кг}$; $b = 0,038 \text{ кг/кг}\cdot\text{ч}$;

для кислорода: $a = 1,35 \text{ кг/кг}$; $b = 1,35 \text{ кг/кг}\cdot\text{ч}$;

для диоксида углерода: $a = 0,90 \text{ кг/кг}$; $b = 0,10 \text{ кг/кг}\cdot\text{ч}$;

для метаболической воды: $a = 0,61 \text{ кг/кг}$; $b = 0,045 \text{ кг/кг}\cdot\text{ч}$.

Используя общую зависимость вида $\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}$, а также соотно-

шение, определяющее количество тепла, выделяемого в процессе биосинтеза при потреблении 1 г кислорода (в среднем 14,2 кДж/г), получим:

- для субстрата (углеводородов): $\alpha^S = 0,85 \text{ кг/кг} + 0,038 \text{ кг/кг} \cdot \text{ч} / 0,18 \text{ ч}^{-1} = 1,06 \text{ кг субстрата на 1 кг биомассы};$
 - для кислорода: $\alpha^{O_2} = 1,35 \text{ кг/кг} + 1,35 \text{ кг/кг} \cdot \text{ч} / 0,18 \text{ ч}^{-1} = 2,08 \text{ кг кислорода на 1 кг биомассы};$
 - для диоксида углерода: $\alpha^{CO_2} = 0,90 \text{ кг/кг} + 0,10 \text{ кг/кг} \cdot \text{ч} / 0,18 \text{ ч}^{-1} = 1,46 \text{ кг диоксида углерода на 1 кг биомассы};$
 - для метаболической воды: $\alpha^{H_2O} = 0,61 \text{ кг/кг} + 0,045 \text{ кг/кг} \cdot \text{ч} / 0,18 \text{ ч}^{-1} = 0,86 \text{ кг метаболической воды на 1 кг биомассы}.$
- Выделение тепла в процессе биосинтеза в пересчете на 2,08 кг (2080 г) поглощенного кислорода составит:
- $$\alpha^Q = 14,2 \text{ кДж/г} \cdot 2080 \text{ г} = 29,5 \text{ тыс. кДж на 1 кг биомассы}.$$

2.3. Закономерности роста периодической культуры микроорганизмов

Рост культуры во времени подчиняется определенной закономерности. Для выявления этой закономерности в питательную среду вносят некоторое количество культуры микроорганизмов и через равные интервалы времени отмечают прирост клеток. На протяжении опыта питательные вещества в среду не добавляют и продукты обмена клеток не удаляют. Такая культура носит название *статической*. Рост статической культуры во времени описывается кривой 1 на рис.2.2.

Эту кривую называют *S-образной* или *кривой роста микроорганизмов*. Она представляет собой обобщенное описание многочисленных экспериментальных наблюдений, в результате которых было установлено, что закономерности роста и развития чистой культуры справедливы и для сложных гетерогенных культур.

Для описания закономерностей микробного роста в гетерогенной культуре в течение опыта оценивают изменение концентрации биомассы X по сухому веществу (в мг/л). Кривая 2 на том же рисунке характеризует процесс потребления клетками субстрата S . На кривой роста

Здесь идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу клеток, а затем, если это необходимо, в целевой метаболит;

- *стадия выделения и очистки целевых продуктов* – четвертая стадия. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных водных растворов или суспензий, содержащих, кроме целевого, большое количество веществ, обладающих близкими физико-химическими свойствами. Это делает весьма специфичной и сложной задачу выделения и очистки основных, с точки зрения производства, продуктов;

приготовление товарных форм продуктов – заключительная стадия биотехнологического производства. Здесь также есть свои особенности. Одна из них – необходимость выпуска некоторых продуктов (аминокислот, ферментов) в стерильной форме, что требует специальных решений на стадии расфасовки и укупорки продукта. На рис. 3.1 приведена схема типового микробиологического производства.

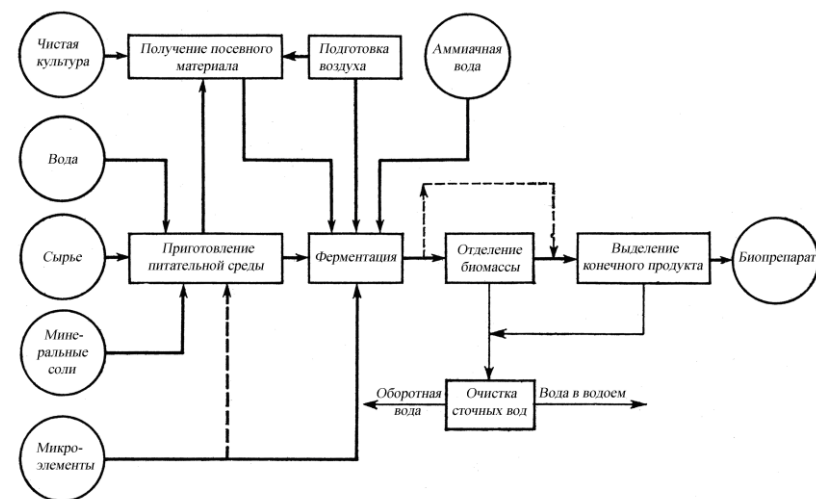


Рисунок 3.1 – Схема типового микробиологического производства

статических условиях?

5. В чем заключается механизм саморегулирования скорости роста культуры в режиме непрерывного культивирования?

6. Какие вы знаете уравнения материального баланса для процесса роста культуры в непрерывном режиме?

7. Изложите методику расчета основных параметров роста культуры в непрерывном режиме с использованием математической модели.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПРОЦЕССОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА

Технологические процессы, базирующиеся на микробном синтезе, можно представить в виде определенной последовательности стадий, причем большинство из них общие для любого микробиологического производства.

К этим стадиям можно отнести следующие пять технологических операций, которые взаимосвязаны, но отличаются по целям и принципам их достижения:

- *приготовление питательной среды* – субстрата с заданными свойствами (рН, температура, концентрация питательных веществ) для выращивания клеток целевой культуры микроорганизмов;
- *получение посевного материала (инокулята)* – чистой культуры микроорганизмов, размноженной до такого количества, которое необходимо для внесения (засева) в промышленный ферментатор, используемый на стадии ферментации. На этой же стадии осуществляется поддержание чистоты культуры штамма, используемого в производстве. Это ключевая задача любого микробиологического производства, поскольку только чистая культура, без примесей других штаммов может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами и продуктивностью;
- *стадия ферментации* – основная стадия, на которой происходит образование целевого продукта (спирта, пива, биомассы дрожжей).

выделяют несколько участков (фаз развития), каждый из которых характеризуется индивидуальными условиями существования культуры. В каждой фазе клеткам присущи своя скорость размножения, размеры и биохимическая активность.

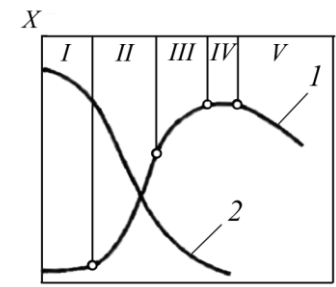


Рисунок 2.2 – Закономерности роста статической культуры:
1 – рост культуры во времени, 2 – кривая потребления субстрата

Фаза I – фаза задержки роста – носит название лаг-фазы (от англ. *lag* – отставание). В лаг-фазе можно выделить два периода. В первом периоде клетки приспосабливаются к условиям окружающей среды, интенсивно синтезируя адаптивные ферменты. Клетки не размножаются ($\mu=0$). В этот период может наблюдаться очень небольшой прирост биомассы за счет увеличения размеров клеток. Во втором периоде лаг-фазы удельная скорость роста μ увеличивается, достигая к концу фазы максимального значения.

За лаг-фазой следует II фаза роста – *логарифмическая* или *экспоненциальная*. Клетки начинают размножаться с постоянной, максимально возможной в данных условиях удельной скоростью ($\mu = \mu_{\max}$). Экспоненциальный рост популяции описывает уравнение

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} \tau}, \quad (2.15)$$

где X_0 – количество биомассы или число клеток в начальный момент времени;

e – основание натурального логарифма.

При логарифмировании этого уравнения получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \tau, \quad (2.16)$$

откуда видно, что логарифм количества биомассы или числа клеток увеличивается с постоянной скоростью. Поэтому эту фазу и называют логарифмической.

Продолжительность этой фазы зависит от запаса питательных веществ в среде, условий аэрации, перемешивания и других факторов. По мере роста культуры в среде постепенно потребляются питательные вещества, накапливаются продукты обмена, затрудняется транспорт питательных веществ (в первую очередь кислорода) и метаболитов вследствие увеличения плотности популяции.

Совокупность этих факторов или один из них обуславливают снижение удельной скорости роста культуры и переход к третьей фазе развития популяции – фазе *замедленного роста*. Интенсивность деления клеток падает, так как изменяются условия существования культуры, уменьшается количество питательных веществ, накапливаются токсичные продукты обмена. Дальнейшее потребление субстрата и выделение метаболитов приводят к полному прекращению роста и переходу культуры в четвертую, *стационарную* фазу. Рост во время стационарной фазы происходит, но число и масса клеток не возрастают, так как одновременно происходит гибель части клеток и автолиз биомассы ($\mu = \epsilon$). Плато на кривой роста соответствует нижней точке на кривой удаления субстрата. Пятая фаза роста – экспоненциальная фаза гибели клеток ($\epsilon = \mu_{\max}$), *фаза отмирания*. К началу этой фазы значительная часть клеток еще живая и использует в качестве источника углерода эндогенные субстраты. Такой процесс называется *эндогенным дыханием*. Сначала клетки окисляют запасные вещества, затем клеточные липиды, углеводы и, наконец, белки. Самоокисление клеточного вещества приводит к уменьшению биомассы. В этой фазе клетки более мелкие, но они устойчивее к физическим и химическим воздействиям окружающей среды.

Характер кривой на рис. 2.2 показывает, что неограниченный рост клеток в статической культуре невозможен. Основные причины этого –

$\frac{dS}{dX} = \alpha^S = \frac{1}{Y}$ получим после соответствующих преобразований:

$$\mu = \frac{b}{\alpha^S - a} = \frac{0,035}{1,03 - 0,8} = 0,152 \text{ ч}^{-1};$$

$$S = \frac{\mu K_S}{\mu_{\max} - \mu} = \frac{0,152 \cdot 0,4}{0,55 - 0,152} = 0,151 \text{ кг/м}^3;$$

$$(S_0 - S) = \alpha^S X; \text{ отсюда } X = \frac{S_0 - S}{\alpha^S} = \frac{20 - 0,151}{1,03} = 19,27 \text{ кг/м}^3;$$

$$Y = \frac{X}{S_0 - S} = \frac{19,27}{20 - 0,151} = 0,97 \text{ или } Y = \frac{1}{\alpha^S} = \frac{1}{1,03} = 0,97;$$

$$P = DX; \text{ так как } \mu = D, \text{ то } P = 0,152 \cdot 19,27 = 29,29 \text{ кг/м}^3 \cdot \text{ч}$$

Степень использования субстрата найдем по формуле

$$\varphi = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100 \%,$$

$$\varphi = \frac{20,0 - 0,152}{20,0} \cdot 100 = 99,24 \%.$$

При известной часовой производительности предприятия по готовому продукту A (кг/ч) можно определить рабочий объем ферментатора (м^3), исходя из соотношения

$$V_P = \frac{A_P}{D}.$$

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. Какими параметрами характеризуется рост клеток микроорганизмов?
2. Дайте характеристику основных способов культивирования микроорганизмов.
3. Как рассчитать удельный расход субстрата и его отдельных компонентов в процессе выращивания клеток?
4. Что показывает характер S -образной кривой роста культуры в

$$D = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}; \quad (2.25)$$

$$X = Y(S_0 - S).$$

Остаточную концентрацию субстрата в ферментаторе в стационарном состоянии культуры можно определить, используя второе уравнение системы (2.25) и решая его относительно S :

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}. \quad (2.26)$$

Подставив (2.26) в последнее уравнение системы (2.25), получим выражение для определения концентрации биомассы в ферментаторе в стационарном состоянии:

$$X = Y(S_0 - S) = Y[S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}]. \quad (2.27)$$

Из уравнений системы (2.25) следует, что для управления непрерывной культурой необходимо знать μ_{\max} , K_S и Y . Эти показатели находят экспериментально в лабораторных условиях при периодическом или непрерывном культивировании с последующим использованием в производстве. При этом лабораторные питательные среды должны соответствовать производственным.

На основе полученных кинетических зависимостей можно определить такие параметры работы ферментатора непрерывного действия, как скорость потока среды D при заданном рабочем объеме аппарата V_p , концентрацию биомассы X и субстрата S , продуктивность аппарата P , выход биомассы с единицы потребленного субстрата Y .

Пример. Определить значения параметров процесса выращивания дрожжей на углеводородном субстрате при следующих значениях коэффициентов модели: $\mu_{\max} = 0,55 \text{ ч}^{-1}$; $K_S = 0,4 \text{ кг/кг}$; $\alpha^S = 1,03 \text{ кг/кг}$; $a = 0,8 \text{ кг/кг}$; $b = 0,035 \text{ кг/кг} \cdot \text{ч}$; $S_0 = 20 \text{ кг/м}^3$.

Используя зависимости вида $\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$; $\alpha^S = a + \frac{b}{\mu}$;

истощение источников питания, изменения в окружающей среде в результате выделения токсичных продуктов обмена, недостаток жизненного пространства.

Периодический способ выращивания микроорганизмов используется на стадии получения посевного материала для многих производств независимо от того, непрерывной или периодической будет главная стадия – ферментация. Несмотря на преимущества непрерывного культивирования, многие промышленные процессы продолжают носить периодический характер из-за трудностей, связанных со свойствами микроорганизмов – продуцентов, и т. п. Поэтому знание стадий развития популяции имеет огромное значение для успешного проведения всего технологического процесса.

При периодическом культивировании не используется в полной мере способность микроорганизмов к максимальному размножению. Период самой активной жизнедеятельности – логарифмическая фаза – занимает лишь небольшую часть производственного цикла, а значительная часть времени уходит на лаг-фазу и период замедленного роста.

При периодическом культивировании клетки все время находятся в изменяющихся условиях. На начальном этапе в питательной среде в избытке имеются все питательные вещества, а затем постепенно возникает дефицит питания и накопление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, ингибирующих рост клеток. Однако существуют методы, позволяющие увеличить время пребывания популяции на одной из фаз развития. К ним относятся:

- метод *дробного дозирования субстрата*, когда питательные вещества вводят в культуральную среду в течение всего периода роста культуры через определенные промежутки времени или непрерывно по каплям;
- метод *отъемно-доливного* культивирования, когда часть культуры периодически удаляется из аппарата при одновременном добавлении эквивалентного количества свежей питательной среды. Это позволяет снизить концентрацию продуктов жизнедеятельности микро-

организмов в среде и сохранить постоянным ее объем.

Однако эти методы не могут обеспечить стабильное физиологическое состояние клеток.

Периодический способ культивирования микроорганизмов находит широкое распространение в микробиологических производствах при получении аминокислот, антибиотиков, ферментных препаратов и других продуктов микробного синтеза. Этому способу присущи недостатки: нестабильный уровень физиологического состояния культуры, сменность режимов, цикличность операций, низкая производительность оборудования, сложность автоматизации и регулирования процессов. Однако на современном этапе в ряде производств от этого метода нельзя отказаться из-за сложности и дороговизны аппаратного оформления непрерывного процесса, обеспечивающего поддержание чистоты производственной культуры.

2.4. Непрерывное культивирование микроорганизмов

Непрерывный способ культивирования микроорганизмов широко используется в микробиологических производствах при получении кормовых дрожжей, спиртов и при биологической очистке сточных вод.

Условием непрерывного глубинного культивирования микробной популяции является непрерывное поступление питательной среды в ферментатор с одновременным отбором из аппарата культуральной жидкости вместе с приросшей биомассой и растворенными продуктами метаболизма. При этом объем ферментационной среды в аппарате, концентрация биомассы, субстратов и продуктов метаболизма в ней должны быть постоянными величинами.

Периодическую культуру можно перевести в режим непрерывного культивирования практически в любой точке восходящей S-образной кривой. Однако в промышленности экономически оправданными являются процессы роста популяции, стабилизированные в фазе замедленного роста. При этом можно достичь высокой степени утилизации субстрата микробной популяцией и устойчивой самостабилизации системы

водят при $\mu = 80\text{--}90\ \% \mu_{\max}$.

Подставив значение μ из (2.22) в формулу (2.19), получим преобразованное математическое уравнение, выражающее рост популяции и вымывание приросшей биомассы из ферментатора:

$$\frac{dX}{dt} = X \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} - DX. \quad (2.23)$$

При непрерывном культивировании микроорганизмов субстрат поступает в ферментатор, потребляется популяцией, и часть его выносятся с культуральной жидкостью. Этот процесс описывается математическим выражением:

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \frac{X}{Y} \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}, \quad (2.24)$$

где DS_0 и DS – приток и отток субстрата; $\frac{X}{Y} \cdot \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$ – потреблен-

ный субстрат; S_0 – концентрация субстрата в приточной питательной среде (глюкоза, парафины и т. д.); S – фактическая концентрация субстрата в отходящей культуральной жидкости; Y – экономический коэффициент, выражающий урожайность популяций и равный отношению образовавшейся биомассы к израсходованному на синтез этой биомассы субстрату.

Математическая модель роста популяции при непрерывном одноступенчатом культивировании описывается системой уравнений (2.22), (2.23), (2.24).

При установившемся режиме непрерывного культивирования (стационарном состоянии культуры) выполняется условие:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0.$$

В этом случае система уравнений принимает вид:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S};$$

Характерная особенность роста популяции микроорганизмов – зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата. Эта зависимость описывается гиперболической функцией, называемой *уравнением Моно*:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}, \quad (2.22)$$

где μ_{\max} – предел, к которому стремится μ при повышении концентрации субстрата S в культуральной жидкости, вытекающей из ферментатора.

Эта зависимость учитывает экспериментально наблюдаемое явление насыщения, когда при высоких концентрациях субстрата удельная скорость роста практически не зависит от S и равна константе μ_{\max} . Параметр K_S – *константа насыщения*, или *константа Моно*, численно равная концентрации субстрата, при которой удельная скорость роста соответствует половине максимальной, т.е. при $S = K_S$ $\mu = 0,5 \mu_{\max}$.

Значение K_S для многих микроорганизмов невелико. Так, при культивировании *Candida quilliermondij* на средах с жидкими парафинами $K_S = 1,1 \text{ кг/м}^3$. Это означает, что при остаточной концентрации парафинов $1,1 \text{ кг/м}^3$ удельная скорость роста составляет 50 % максимальной.

Из формулы Моно (2.22) следует, что μ_{\max} – чисто математический предел скорости роста популяции, который практически достичь невозможно.

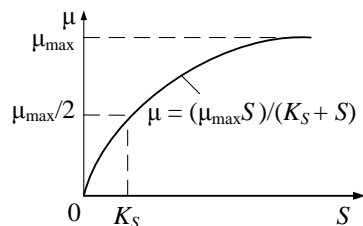


Рисунок 2.3 – Зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата

Культивирование в промышленных ферментаторах обычно про-

при скоростях роста, близких к максимальным.

Непрерывное культивирование заключается в непрерывной подаче питательных веществ в ферментатор в таком количественном и качественном соотношении, которое необходимо для поддержания микроорганизмов в экспоненциальной фазе развития. В этих условиях достигается подвижно-равновесное состояние, при котором клетки размножаются со скоростью, соответствующей притоку питательных веществ. Одновременно часть культуральной среды вместе со взвешенными в ней клетками с той же скоростью непрерывно вытекает из ферментатора, однако количество микроорганизмов, поддерживающее непрерывный процесс, остается в ферментаторе постоянным.

Одной из важных характеристик непрерывного культивирования является *скорость разбавления среды* в аппарате (или скорость обмена питательной среды в аппарате) потоком питательной среды, ч^{-1} . Если обозначить полезный (рабочий) объем ферментатора V_p (м^3), а скорость поступления среды – скорость протока – F ($\text{м}^3/\text{ч}$), то скорость разбавления D (ч^{-1}) будет равна:

$$D = F / V_p. \quad (2.17)$$

Исходя из соотношения для удельной скорости роста микроорганизмов

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

мгновенный прирост биомассы можно выразить как

$$\frac{dX}{dt} = \mu X. \quad (2.18)$$

В условиях непрерывного культивирования мгновенный прирост биомассы μX компенсируется ее уносом со средой DX . Процессы прироста биомассы и уноса приросшей биомассы с культуральной жидкостью из ферментатора описываются уравнением

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX. \quad (2.19)$$

Поскольку при непрерывном культивировании концентрация

биомассы X в биореакторе является величиной постоянной и, следовательно, мгновенный прирост биомассы $\frac{dX}{dt} = 0$, то в уравнении (2.19) разность

$$(\mu X - DX) \text{ равна } 0, \text{ т. е. } \mu X = DX.$$

Следовательно,

$$\mu = D. \quad (2.20)$$

Равенство (2.20) является основным условием поддержания установившегося равновесия при непрерывном культивировании микроорганизмов. В этом случае все технологические и физиологические показатели сохраняются постоянными. К технологическим показателям относятся концентрация компонентов культуральной жидкости, а к физиологическим – скорость роста клеток и их морфологические и биохимические особенности.

Установившийся режим при непрерывном культивировании, когда скорость разбавления находится в равновесии с удельной скоростью роста, необходимо контролировать и поддерживать притоком питательной среды. Однако система непрерывного культивирования микроорганизмов обладает способностью саморегулирования.

Если установившийся режим будет нарушен изменением скорости разбавления, т.е. произойдет изменение скорости подачи питательной среды, то система выйдет из равновесия и возникнет ряд связанных с этим изменений ее параметров.

Предположим, что скорость разбавления стала меньше удельной скорости роста микроорганизмов, т. е. $D < \mu$. Это значит, что приток питательной среды в реактор F уменьшился. В этой связи время пребывания среды в ферментаторе увеличивается, и концентрация биомассы X начинает повышаться, что приводит к убыли питательных веществ и накоплению продуктов обмена. Все это неблагоприятно отражается на скорости роста, и она начинает падать. Вследствие этого разность $(\mu - D)$ стремится к нулю, а система – к установлению нового подвижного равновесия. При этом концентрация биомассы стабилизируется на но-

вом, более высоком уровне по сравнению с первоначальным.

Если скорость разбавления станет выше удельной скорости роста ($D > \mu$), то, наоборот, увеличится F , концентрация питательных веществ возрастет, что положительно повлияет на удельную скорость роста – она увеличится. В результате система придет к новому устойчивому режиму, соответствующему более высокой концентрации питательных веществ и более низкой концентрации биомассы.

Таким образом, изменяя входные данные (скорость потока или состав питательной среды), можно переводить систему клетка – среда из одного подвижно-равновесного состояния в другое. Из этого следует, что непрерывные процессы обладают саморегулирующей способностью в пределах $(\mu - \mu_{\max})$, т.е. до достижения максимальной удельной скорости роста. Когда скорость разбавления превысит максимальную удельную скорость роста ($D > \mu_{\max}$), то через определенный срок все микроорганизмы будут вымыты из ферментатора.

Одним из важных показателей непрерывного культивирования является *продуктивность*, которая определяется произведением скорости разбавления на концентрацию биомассы:

$$P = DX. \quad (2.21)$$

Максимум продуктивности достигается при максимальной скорости разбавления, которая называется критической $D_{\text{кр}}$. При такой скорости биомасса вымывается из ферментатора.

2.5. Математическое описание процессов непрерывного культивирования микроорганизмов

Для процессов непрерывного культивирования клеток существуют определенные количественные зависимости между концентрацией биомассы X , концентрацией субстрата S и удельной скоростью роста μ .

Математическую модель процесса биосинтеза обычно составляют в виде системы дифференциальных уравнений материального баланса, описывающих динамику изменения концентраций биомассы, субстратов и основных продуктов метаболизма.

заданной температуре стерилизации.

Пример расчета продолжительности стерилизации в изотермических условиях

Колба содержит 100 мл питательной среды, обсемененной спорами в количестве 10^6 на 1 мл. При температуре стерилизации 140°C , константе удельной гибели спор $k = 104,8 \text{ мин}^{-1}$ и $b = 0,01$ время стерилизации τ составит

$$\tau = \frac{2,3}{104,8} \cdot \lg \frac{10^6 \cdot 100}{0,01} = 0,22 \text{ мин}.$$

При стерилизации той же среды в аппарате полезной вместимостью 100 м^3 время стерилизации составит:

$$\tau = \frac{2,3}{104,8} \cdot \lg \frac{10^6 \cdot 100 \cdot 10^6}{0,01} = 0,35 \text{ мин},$$

т.е. для обеспечения равной эффективности среду в аппарате надо выдерживать при той же температуре в 1,6 раза дольше, чем в колбе.

Эта оценка является приближенной, так как на практике необходимо учитывать, что нагревание среды до выбранной температуры стерилизации и последующее охлаждение происходит не мгновенно, а за некоторый конечный промежуток времени, величина которого также влияет на суммарную эффективность процесса стерилизации.

График изменения температуры стерилизуемого объекта выглядит следующим образом (рис.3.4)

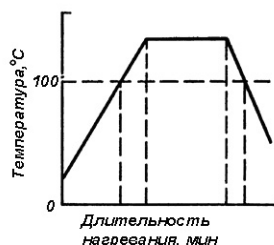


Рисунок 3.4 – Зависимость изменения температуры объекта при стерилизации

животными тканями.

Для активного развития автотрофов и гетеротрофов наряду с углеродом необходимы источники азота, фосфора, калия, натрия и других компонентов.

По отношению к источникам азота микроорганизмы делят на автоаминоавтотрофы и гетероаминоавтотрофы. *Автоаминоавтотрофы* используют азот минеральных веществ. *Гетероаминоавтотрофы* используют азот органических соединений (аминокислот, белков и др.).

Общие сведения о производственных питательных средах

Питательные среды должны содержать основные вещества, обеспечивающие оптимальный рост микроорганизмов. Для осуществления биосинтеза, роста и размножения клетка должна получать извне в необходимых количествах все содержащиеся в ней элементы.

По физическому состоянию питательные среды можно разделить на три группы: *твердые* (приготовленные на агар-агаре, желатине), *жидкие* и *сыпучие* (увлажненные отруби, зерно).

По составу питательные среды делят на две основные группы: натуральные и синтетические.

Натуральными называют среды неопределенного химического состава, которые включают продукты животного или растительного происхождения. Основой для натуральных сред являются различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, овощи, фрукты. Подавляющее их большинство используется в виде экстрактов и настоев. В состав производственных сред входят вещества, богатые углеводами (кукурузная мука, гидролат, патока, пшеничная мука) и азотом (белковые продукты – соевая мука, жмыхи, кукурузный экстракт).

Натуральные среды непостоянны по составу, так как существенно зависят от сырья и условий приготовления, поэтому они малоприспособлены для многотоннажных производств.

Синтетические среды – это такие, в состав которых входят определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных

концентрациях. Их готовят на дистиллированной воде. Синтетические среды могут быть довольно простыми, т.е. состоять из небольшого числа веществ, а могут быть комплексными, т.е. составленными из большого числа различных компонентов. В настоящее время в распоряжении специалистов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам сложным натуральным средам.

Характеристика основных компонентов производственных питательных сред

Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Исключительное многообразие микроорганизмов делает число таких соединений почти безграничным, так как, с одной стороны, существуют культуры, способные в процессе биосинтеза потреблять углерод только из высокоорганизованных молекул, например белков и пептидов, а с другой, – многие бактерии и отчасти дрожжи утилизируют такие простейшие углеродсодержащие соединения, как метанол и даже диоксид углерода.

Кроме углерода, клетки микроорганизмов в процессе роста испытывают необходимость в источниках азота, фосфора, макро- и микроэлементов. Все вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей. В подавляющем большинстве случаев в промышленные среды для культивирования предварительно вносятся все необходимые элементы питания, кроме кислорода, и в некоторых производствах – углерода, если последний вводится в виде газообразного соединения (CH_4 , CO_2 и т. п.).

Ниже приводится характеристика основных источников питательных веществ, используемых микроорганизмами.

Источники углерода в питательных средах:

- *метиловый спирт*; получают каталитическим синтезом из оксида углерода и водорода, из природного газа (метана) и при химической переработке древесины. Благодаря высокой чистоте и неограни-

так как сами обладают антисептическим действием: метанол, этанол, уксусная кислота и др.

В непрерывных условиях стерилизации время выдержки среды при выбранной температуре

$$\tau = \frac{2,3}{k} \lg \frac{N_0}{N} . \quad (3.6)$$

Зная температуру стерилизации, по табл. 3.1 находят константу k . Количество жизнеспособных спор N_0 во всем объеме питательной среды до стерилизации:

$$N_0 = C_0 V_{\text{ж}} 10^6 ,$$

где C_0 – количество спор в 1 мл среды (определяется экспериментально или принимается равным 1700 – 2000); $V_{\text{ж}}$ – объем стерилизуемой жидкости, м^3 .

Из формулы (3.6) следует, что с уменьшением количества жизнеспособных спор N в стерилизуемой питательной среде время выдержки возрастает. Таким образом, практически нестерильных операций быть не может, так как в противном случае время выдержки бесконечно. В большинстве случаев экономически целесообразным является режим стерилизации, при котором из 100 операций 1–3 нестерильны, т. е. выживают 1–3 споры или $(1-3)/100 = 0,01 - 0,03$.

Последнее соотношение носит название *вероятность нестерильности* и обозначается как b . Заменяя в уравнении (3.6) N на b , получим выражение для определения времени выдержки среды в изотермических условиях:

$$\tau = \frac{2,3}{k} \cdot \lg \frac{N_0}{b} . \quad (3.7)$$

Из приведенных уравнений видно, что режим стерилизации существенно зависит от исходного количества микроорганизмов. Последнее определяется обсемененностью стерилизуемого объекта (например, питательной среды), а также его объемом.

Пользуясь уравнением (3.7), можно рассчитать время, необходимое для достижения заданной степени (критерия) стерилизации при

В микробиологической промышленности при больших расходах стерильных питательных сред используют непрерывные способы стерилизации, при которых нагрев и охлаждение среды протекают в течение нескольких секунд.

Основным недостатком термической стерилизации, несмотря на ее широкое практическое использование, следует считать неизбежные потери питательных свойств среды, поскольку при температурах, необходимых для стерилизации (порядка 120–150 °С), большинство субстратов, особенно углеводы, оказываются термически нестабильными. Это заставляет очень жестко контролировать время и температуру термического воздействия на субстрат. Для предотвращения распада максимального количества углеводов, витаминов и других полезных компонентов стерилизацию рекомендуется проводить быстро при высоких температурах.

С повышением температуры стерилизации, согласно уравнению Аррениуса, увеличение константы инактивации спор

$$k = Ae^{-E/RT}$$

значительно превосходит рост константы скорости разложения любого из термолабильных компонентов питательной среды:

$$k_1 = A_1 e^{-E_1/RT},$$

где E и E_1 – энергии активации гибели спор и разложения термолабильного компонента соответственно.

Это связано с большой разницей между энергиями активации термической гибели спор и реакции разложения термолабильных компонентов. Так, энергия активации гибели спор бактерий *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518 равна 280 кДж/моль, энергия реакции разложения глюкозы – около 150 кДж/моль и для многих витаминов – 50–70 кДж/моль. Однако температура стерилизации в промышленных аппаратах не должна превышать 140 °С, так как с ее увеличением возрастают капитальные затраты на теплообменную аппаратуру, эксплуатационные расходы на пар и охлаждающую воду.

Существует ряд субстратов, которые не требуют стерилизации,

ченной растворимости в воде метиловый спирт относится к перспективным источникам углеродсодержащего сырья для крупнотоннажных производств, например, микробного кормового и пищевого белков;

- *этиловый спирт*; получают микробиологическим способом и химическим путем – гидратацией этилена. Синтетический этиловый спирт значительно дешевле полученного микробиологическим способом и является источником углерода при производстве микробного кормового и пищевого белков и других продуктов микробиологического синтеза;

- *уксусная кислота*; является продуктом химического синтеза. В зависимости от сорта содержит от 80 до 99,5 % CH_3COOH . Уксусная кислота является перспективным видом сырья в производстве аминокислоты (лизина);

- *древесное сырье*; представляет собой многолетние растительные ткани, содержащие целлюлозу, лигнин и другие вещества. Источником углерода в этом сырье могут быть гексозы, пентозы, органические кислоты. В сырье они в свободном состоянии практически не встречаются, но могут быть получены в результате специальной обработки – гидролиза при высоких температурах в гидролиз-аппаратах. Полисахариды древесины в процессе гидролиза превращаются в растворимые в воде моносахариды, которые легко усваиваются микроорганизмами.

В промышленном производстве используется, как правило, не целостная древесина, а отходы ее переработки – горбыль, щепа, опилки. Помимо отходов деревообработки, могут использоваться сельскохозяйственные отходы: подсолнечная лузга, кукурузные кочерыжки, рисовая шелуха, солома, а также *малоразложившийся торф*, который кроме полисахаридов (50 %) содержит азот и фосфор в доступной для микроорганизмов форме. Раствор, получаемый в процессе гидролиза древесины, называется *гидролизат*; качество его как субстрата для выращивания микроорганизмов оценивается по содержанию моносахаридов. Содержание сахаров в гидролизатах зависит от свойств сырья, способа

гидролиза и других факторов;

- *меласса*; является отходом свекло-сахарного и тростниково-сахарного производства, содержащим от 67 до 85 % сухих веществ. Основными компонентами мелассы являются сахароза (40–55 %) и зольные вещества (8–13 %). Кроме того, она содержит комплекс витаминов, аминокислот и других факторов роста. Меласса является сырьем при производстве пищевых дрожжей и этилового спирта, аминокислот, антибиотиков и других продуктов микробного синтеза;

- *мелассная барда*; является отходом мелассно-спиртовых заводов и содержит 7–10 % сухих веществ. В сухие вещества входит около 70–80 % органических компонентов и до 20–30 % неорганических соединений. Значительную часть органических компонентов составляют органические кислоты, азотсодержащие соединения и небольшую часть – углеводы;

- *молочная сыворотка*; является побочным продуктом при производстве сыра, творога и казеина и содержит 5,3–6,9 % сухих веществ. В ее состав входят 4–4,8 % молочного сахара, 0,5–1 % белка, 0,5–0,7 % зольных веществ, 0,05–0,4 % жира и биологически активные вещества. Молочная сыворотка является перспективной питательной средой при производстве различных продуктов микробного синтеза;

- *кукурузная мука*; содержит 67–70 % крахмала и около 10 % других углеводов, 10–12 % белка, до 4 % жира, 0,8–1,0% зольных элементов и биологически активные вещества. Кукурузная мука входит в состав питательных сред главным образом как источник углеводов.

Источники азота в питательных средах

В составе микроорганизмов азота в 5–6 раз меньше, чем углерода, так как значительная часть потребляемого микроорганизмами углерода расходуется на энергетические цели. Поэтому содержание углерода в питательных средах должно быть гораздо больше, чем азота. Тем не менее, даже небольшой недостаток азота в питательной среде приводит к «ожирению» клеток, т. е. повышению содержания в них липидов за

Влияние температуры на изменение константы k может быть выражено уравнением Аррениуса:

$$k = Ae^{-E/RT}$$

тогда выражение (3.2) принимает вид

$$\Delta = A \int_0^{\tau} e^{-E/RT} d\tau, \quad (3.4)$$

где A – константа Аррениуса, мин^{-1} ; E – энергия активации, необходимая для разрушения (гибели) спор, Дж/моль; R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль °C); T – температура стерилизации, К.

При изотермических условиях стерилизации

$$\ln \frac{N_0}{N} = k\tau \quad \text{или} \quad \Delta = k\tau. \quad (3.5)$$

Уравнение (3.5) позволяет рассчитать время выдержки среды τ при заданной температуре стерилизации, которое обеспечивает достижение заданной степени (критерия) стерилизации.

Для расчета эффективности режима стерилизации по уравнению (3.4) необходимо знать энергию активации гибели спор и константу Аррениуса.

В табл. 3.1 приведены зависимости константы удельной скорости гибели, критерия стерилизации спор штамма бактерий *Bacillus stearothermophilus* от температуры.

Таблица 3.1– Значения константы удельной гибели спор и критерия стерилизации при различных температурах

$t, ^\circ\text{C}$	$k, \text{мин}^{-1}$	Δ	$t, ^\circ\text{C}$	$k, \text{мин}^{-1}$	Δ
105	0,048	0,167	130	14,8	72,38
110	0,163	0,719	132	18,60	107,58
115	0,540	2,400	134	20,50	160,48
120	1,480	7,550	136	48,80	244,48
122	2,440	11,825	138	72,20	377,68
124	3,756	18,665	140	104,8	575,98
126	5,900	29,130	142	148,0	841,98

ного действия высоких температур на живые клетки.

В исходной питательной среде всегда находятся разнообразные микроорганизмы, вегетативные клетки которых быстро погибают уже при температуре 70–100 °С и практически мгновенно – при температуре выше 110 °С. Для спор бактерий и особенно для представителей рода *Bacillus* характерна высокая термическая устойчивость. Поэтому при расчетах аппаратов и установок для термической стерилизации и выборе режимов стерилизации питательных сред пользуются в основном константами гибели наиболее термически устойчивых спор бактерий *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518. В связи с этим рассмотрение вопросов термической стерилизации питательных сред или их компонентов обычно связывают с инактивированием спор этого штамма.

Гибель (отмирание, разрушение) микроорганизмов под воздействием тепла можно описать уравнением

$$\frac{dN}{d\tau} = -kN, \quad (3.1)$$

где N – количество жизнеспособных микроорганизмов (спор) в объеме стерилизуемой жидкости к моменту времени τ ; k – константа удельной скорости гибели спор (константа инактивации), мин^{-1} .

После интегрирования приведенного уравнения в пределах от N_0 до N и от 0 до τ получается следующее выражение:

$$\ln \frac{N_0}{N} = \int_0^{\tau} k d\tau, \quad (3.2)$$

где N_0 – количество жизнеспособных микроорганизмов во всем объеме жидкости до стерилизации ($\tau = 0$).

Левую часть уравнения можно выразить через Δ :

$$\Delta = \ln \frac{N_0}{N}, \quad (3.3)$$

где Δ – безразмерный критерий стерилизации; характеризует убыль жизнеспособных спор, используется при оценке различных режимов стерилизации.

счет уменьшения содержания белков и аминокислот.

Источниками азота для большинства микроорганизмов являются сложные органические, а также неорганические азотсодержащие вещества:

- *кукурузный экстракт* – побочный продукт крахмало-паточного производства. При производстве крахмала кукурузное зерно замачивают в воде, а затем упаривают замочные воды до содержания сухого вещества (48–50%). В процессе замачивания зерна происходит ферментативный гидролиз белков кукурузы, вследствие этого около половины азотсодержащих веществ экстракта представляет собой смесь аминокислот, полипептидов и белков. Кроме того, экстракт содержит витамины группы В (биотин), некоторые ростовые вещества и биостимуляторы. Таким образом, ценность кукурузного экстракта как компонента питательной среды определяется наличием хорошо ассимилируемых источников органического азота, углерода и микроэлементов;
- *отруби пшеничные* – отход зерноперерабатывающего производства. Он содержит (в %): азотистые вещества – 15,0, крахмал – 22; пентозаны – 24, а также сахарозу, жиры, зольные элементы;
- *соевую муку* получают при размалывании соевого зерна, а также соевого жмыха и шрота, образующихся после извлечения соевого масла. Содержит до 30 % азотсодержащих веществ, главным образом, белков. Основным белком является глицин, который содержит почти все аминокислоты. В соевой муке содержится до 25 % углеводов, (4,5–6,5 %) золы, витамины группы В, Д и А. В состав золы входит около 45 % оксида калия, 30 % фосфорного ангидрида и 7,0 % оксидов магния и кальция, а также ряд микроэлементов;
- *нитрат аммония* (аммиачная селитра) NH_4NO_3 – бесцветные кристаллы, хорошо растворяются в воде с поглощением теплоты; водные растворы имеют кислую реакцию. Используется как источник азота и для подкисления среды;
- *сульфат аммония* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – хорошо растворяется в воде с поглощением теплоты; содержание азота (20–21) %;

- *карбамид* (мочевина) $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ – высококонцентрированный (46,5 %) источник азота. При использовании следует учитывать, что карбамид при термической стерилизации разрушается;

- *аммиачная вода* NH_4OH – бесцветная жидкость с резким специфическим запахом, легко испаряется, ядовита. Используется как источник азота и регулятор pH среды. Аммиачная вода I сорта содержит не менее 25 %, а II сорта – не менее 20 % азота;

Помимо перечисленных, в качестве азотсодержащего сырья используют гидролизат мезги, экстракт солодовых ростков, пивную дробину и т.д.

Источники фосфора в питательных средах

Фосфор является очень важным элементом питательной среды. Он обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также главных биосинтетических процессов (синтез белков и нуклеиновых кислот, гликолиз). От концентрации фосфора в среде зависит скорость роста культуры. Источниками фосфора являются:

- *аммофос*; представляет собой смесь моноаммонийфосфатов $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ и диаммонийфосфатов $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, а также нерастворимых примесей (шлама), составляющих 6–7 % к массе сухого вещества. Аммофос является источником не только фосфора, но и азота;

- *ортофосфорная* (фосфорная) *кислота* H_3PO_4 – используется как источник фосфора и для подкисления среды. Содержание P_2O_5 – 50,7 %.

Источники витаминов, макро- и микроэлементов

Обмен веществ в клетках микроорганизмов не может протекать без витаминов, макро- и микроэлементов. Микроорганизмы, как правило, не способны синтезировать витамины, поэтому необходимо их введение в состав среды. Наибольшая потребность у микробов существует в комплексе витаминов группы В, куда входят тиамин, никотиновая, пантотеиновая кислоты, пиридоксин, инозит и биотин. Наибольший

Сюда же подают раствор минеральных солей и микроэлементов.

В реакторе-смесителе все поданные в необходимых количествах компоненты тщательно перемешиваются, pH среды доводится до необходимого значения подачей аммиачной воды или кислоты.

Реакторы для приготовления питательной среды должны быть снабжены достаточно мощными мешалками, а также перегородками-отражателями, не допускающими завихрения и вращения жидкости.

Важнейшим элементом приготовления питательных сред является соблюдение требований асептики. В разных производствах предъявляют различные требования к стерильности сред. В крупнотоннажных производствах, таких, как производство этилового спирта, пищевых и кормовых дрожжей, процесс ферментации проводится при нестрогих требованиях к стерильности. В этом случае достаточно создать определенное значение pH среды, при котором хорошо развивается основная культура, а развитие посторонних микроорганизмов подавляется. Для процессов выращивания чистых культур микроорганизмов, производства ферментов, аминокислот обязательна строгая стерилизация всех подаваемых в биореактор потоков и самого биореактора. В этом случае для стерилизации газовых потоков, в первую очередь воздуха, используют процесс фильтрации через специальные волокнистые фильтры, изготовленные из полипропилена, целлюлозы, микроволокна и др. Они обеспечивают практически стопроцентную очистку и стерилизацию воздуха. Основным требованием к фильтрующему материалу является допустимость его периодической стерилизации, обычно осуществляемой подачей острого пара в отключенный фильтр через заданные промежутки времени.

Метод фильтрации применяют и для стерилизации термолабильных жидкостей (мочевины, аммиачной воды).

Жидкостные потоки стерилизуют различными методами, из которых практический интерес представляют термический, радиационный, фильтрационный, химический. Самый распространенный в промышленности метод – термический – основан на известном факте губитель-

устройство и поочередно подаются необходимые соли, которые подбираются таким образом, чтобы при их совместном растворении не образовывался осадок. Для повышения скорости растворения ряда солей в рубашку аппаратов 1 и 2 может подаваться греющий пар. Процесс растворения продолжается 20–30 мин, затем раствор поступает в отстойник 3, где удаляются нерастворимые примеси и осадок, если он образовался при совместном растворении солей.

Осветленный раствор после отстойника 3 насосом перекачивается в реактор-смеситель для смешивания с остальными компонентами питательной среды.

На рис. 3.3 приведена общая технологическая схема приготовления питательной среды.

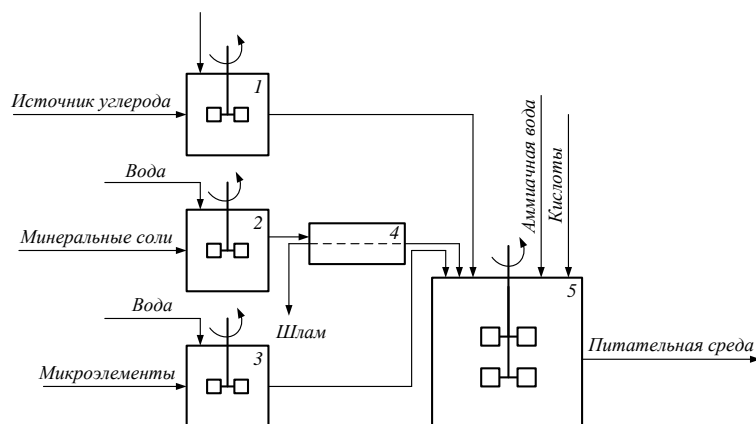


Рисунок 3.3 – Схема приготовления питательной среды:
1–3 – реакторы; 4 – отстойник; 5 – реактор-смеситель

Растворимые источники углерода (например, сахара) предварительно растворяют в воде, доводя растворы до определенной концентрации, в небольших открытых реакторах с мешалками, а затем подают в закрытый реактор-смеситель.

Нерастворимые источники углерода тщательно суспендируют в воде в реакторе с мешалкой и переводят суспензию в реактор-смеситель.

недостаток у микроорганизмов обнаруживается в биотине. Витамины вносятся либо с сырьем, в котором они содержатся, либо отдельно.

Макро- и микроэлементы входят в состав активных центров ферментов, обеспечивающих обмен веществ микроорганизмов, активирующих процессы дыхания, окислительно-восстановительные реакции и другие процессы жизнедеятельности клетки.

Наибольшее влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывают ионы калия, железа, меди, марганца, цинка, бора, молибдена, кобальта и ряда других элементов. Микроорганизмы обычно нуждаются в микродозах этих элементов. Повышенная концентрация этих элементов оказывает ингибирующее действие на рост и развитие микроорганизмов.

В качестве источников калия используются соли: карбонат калия K_2CO_3 , сульфат калия K_2SO_4 , хлорид калия KCl . Источниками магния, марганца, железа, цинка обычно являются их сульфаты.

Вода

Вода необходима для развития микроорганизмов не меньше, чем питательные вещества. Она является основой жидких питательных сред. От качества воды во многом зависит качество готовой среды, поэтому ее состав, свойства, содержание примесей жестко регламентированы.

Для приготовления питательных сред воду берут из водопровода, артезианских скважин или открытых водоемов после соответствующей обработки. Вода должна быть биологически чистой, бесцветной, без привкуса и запаха, не должна давать осадка. Сухой остаток воды не должен превышать 1000 мг/л, общая жесткость не должна быть больше 7 мг-экв/л. Слишком жесткая вода замедляет рост микроорганизмов.

Содержание вредных примесей в воде не должно превышать следующих значений, мг/л:

Свинец	0,1	Цинк	5,0
Мышьяк	0,05	Медь	3,0
Фтор	1,5		

Общее число микроорганизмов в 1 мл воды не должно превышать 100.

В микробиологической промышленности воду используют не только для приготовления сред, но и для охлаждения, для мытья аппаратов и т. д. Микробиологическое производство требует большого количества чистой воды. Так, например, в производстве хлебопекарных дрожжей на получение 1 т дрожжей расходуется 150–180 м³ воды.

Принципы составления питательных сред

Для нормального роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов метаболизма недостаточно только присутствия в питательной среде всех необходимых компонентов. Необходимо также, чтобы эти компоненты содержались в определенных соотношениях. Кроме того, из большого числа источников того или иного компонента нужно выбрать наиболее соответствующий физиологическим потребностям данной культуры.

С технико-экономической точки зрения питательная среда – это сырье для получения целевого продукта. Сырье должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легко доступным. Можно применять и дорогостоящее сырье, но в этом случае прибыль от сбыта продукта должна компенсировать затраты на приобретение сырья.

Для предварительного подбора количества компонентов питательной среды обычно пользуют данные химического состава биомассы. Разумеется, питательная среда, составленная на основе примерного баланса компонентов, вряд ли обеспечит оптимальные условия для роста культуры. Она является лишь исходной точкой для подбора оптимального состава среды, который проводят экспериментально, варьируя в определенных пределах концентрации всех компонентов среды. При подборе состава сред часто используют математические методы планирования и обработки экспериментов, что резко сокращает трудоемкость и длительность работы.

Технология приготовления питательных сред

В процессе приготовления питательной среды отдельные ее компоненты растворяются в воде, образуя истинные (минеральные соли,

сахара, спирты) или коллоидные (белки, липиды) растворы. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу.

Каждый конкретный микробиологический процесс имеет свои особенности на стадии приготовления питательных сред, и это, в первую очередь, связано с применяемым в данном производстве источником углерода.

Отделение приготовления питательной среды в современном микробиологическом производстве представляет собой, как правило, цех, оборудованный емкостями для хранения твердых и жидких веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий. При этом питательные соли хранятся обычно в твердом виде, а приготовление их смеси с заданным соотношением компонентов производится в аппаратах с мешалками, куда непосредственно подаются твердые компоненты в необходимом количестве и далее проводится их растворение. Технологическая схема этого участка приведена на рис.3.2.

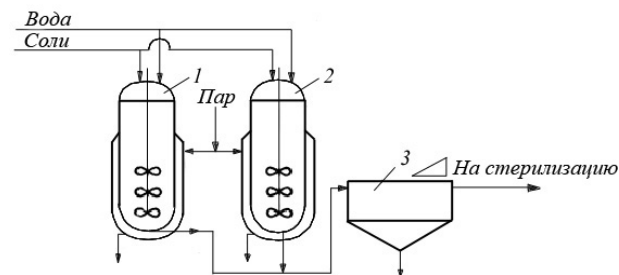


Рисунок 3.2 – Технологическая схема приготовления растворов питательных солей и микроэлементов

Необходимые соли со склада транспортером через дозировочные устройства (весы) подаются в заданном количестве в аппарат 1 или 2, работающие поочередно для обеспечения непрерывной подачи растворов солей на стадию ферментации. Аппарат предварительно заполняется водой на 50–60 % (по объему), затем включается перемешивающее

отдается новейшим конструкциям аппаратов – соплоконусным, колонным, с твердой насадкой – широкое употребление находят и традиционные варианты, включая аппарат с обычной механической мешалкой и барботером.

До сих пор не существует стандартных инструкций на применение биореакторов, пригодных для любого биотехнологического процесса, хотя существует большое количество эмпирических наблюдений.

Общие теоретические положения о соответствии между типами процессов и аппаратов находятся в стадии разработки.

3.3.3. Системы теплообмена биореакторов

Теплообмен представляет собой также важную составную часть процессов, протекающих в биореакторе, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта в существенной мере зависят от температуры. Большинство освоенных биотехнологических процессов протекает при температурах 30–50 °С (мезофильные условия). Это имеет свои преимущества, поскольку для поддержания оптимума температуры лишь в редких случаях приходится прибегать к специальному подогреву. Серьезной проблемой, однако, является удаление избыточной теплоты, выделяемой в процессе жизнедеятельности культивируемых клеток, поэтому биореактор должен иметь систему теплообмена.

Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняются наличием в биореакторе большого количества контактирующих поверхностей. Теплообмен происходит между клеткой и питательной средой, между средой и стенкой аппарата, между стенкой и охлаждающей (нагревающей) жидкостью теплообменного устройства, между этой жидкостью, стенкой теплообменника и наружной средой. Система теплообмена должна чутко реагировать на изменения количества тепла, происходящие в ходе культивирования биообъекта, поддерживать температуру на постоянном уровне (режим термостатирования) или контролировать ее изменения по заданной программе. Например, на первых этапах роста культуры биореактор прогревают, а далее встает задача

Первый участок кривой соответствует нагреванию до заданной температуры, второй – выдерживанию при этой температуре, третий – охлаждению. При расчете стерилизующего эффекта рассматривают лишь ту часть кривой, которая соответствует температуре выше 100 °С, так как при более низкой температуре удельная скорость гибели термостойких спор ничтожно мала. Значение критерия стерилизации можно определить как сумму величин, соответствующих каждому участку кривой:

$$\Delta = \Delta_{\text{н}} + \Delta_{\text{в}} + \Delta_{\text{охл}} , \quad (3.8)$$

где $\Delta_{\text{н}}$, $\Delta_{\text{в}}$, $\Delta_{\text{охл}}$ – критерии стерилизации на участках нагревания, выдерживания и охлаждения.

Расчет $\Delta_{\text{в}}$ не представляет труда, он описан выше в формуле 3.5. Для расчета $\Delta_{\text{н}}$ и $\Delta_{\text{охл}}$ пользуются формулой

$$\Delta_{\text{н(охл)}} = \Delta_{\tau} \frac{\tau_{\text{н(охл)}}}{t_{\text{ст}} - 100} \cdot a , \quad (3.9)$$

где Δ_{τ} – табличное значение критерия стерилизации, достигаемое при условии, что объект нагревается (или охлаждается) со скоростью 1 град, в 1 мин; $\tau_{\text{н(охл)}}$ – действительное значение длительности нагревания от 100 °С до $t_{\text{ст}}$ (или охлаждения от $t_{\text{ст}}$ до 100 °С), мин; $t_{\text{ст}}$ – температура стерилизации, °С; a – коэффициент, $a=1$ град/мин.

Значения Δ_{τ} , приведенные ниже, получены при нагревании (охлаждении) спор *Bac. stearothermophilus* штамм 1518 до заданной температуры со скоростью 1 град/мин.

Температура, °С	120	122	124	126	128	130	132
Δ_{τ}	6,8	10,6	16,8	26,2	41,2	65,0	98,3

Пример расчета суммарного значения критерия стерилизации.

Определить суммарное значение критерия стерилизации для следующего режима: длительность нагревания от 100 до 123 °С – 10 мин., выдерживания при 123 °С – 15 мин., охлаждения до 100 °С – 20 мин.

Определим значения $\Delta \tau = 13,35$ (среднее между 10,6 и 16,8) и константу $k = 3,07$, соответствующее температуре стерилизации 123 °С.

Тогда величины критерия стерилизации для стадии нагревания $\Delta_n = 13,35 \cdot 10/23 = 5,8$, для стадии охлаждения $\Delta_{охл} = 13,35 \cdot 20/23 = 11,6$ и для стадии выдерживания $\Delta_v = 3,07 \cdot 15 = 46,1$. Суммарное значение Δ при таком режиме:

$$\Delta = 5,8 + 11,6 + 46,1 = 63,5.$$

Для гарантированного обеспечения стерильности нужно, чтобы значение Δ было не меньше заданной величины, а именно $\Delta \geq 40-45$. Поскольку рассчитанное суммарное значение критерия стерилизации (63,5) больше этой величины, то можно считать, что заданный режим стерилизации обеспечивает гарантированное (с вероятностью 99 %) уничтожение термостойких спор.

Другие методы стерилизации в силу различных причин нашли значительно меньшее распространение. В частности, радиационный метод, основанный на облучении материалов большими дозами ионизирующих излучений, главным образом γ -излучением, дает хорошие результаты при стерилизации небольших объектов. Промышленное использование γ -излучения для стерилизации жидких и газообразных сред, безусловно, возможно, но применяется редко из-за трудностей создания и эксплуатации необходимых в этом случае мощных источников γ -квантов; использование же маломощных излучателей делает процесс экономически неэффективным.

В отдельных случаях применяют химические стерилизующие агенты, т. е. вещества с явно выраженным сильным асептическим действием. Основной проблемой в этом случае оказывается необходимость устранения стерилизующего агента из питательной среды после гибели посторонней микрофлоры и до внесения основной культуры. Химические антисептики должны быть не только высокоэффективными, но и легко разлагаемыми после завершения стерилизации. К сожалению, выбор таких веществ невелик, и их нельзя считать легко доступными. К числу лучших из них относится пропиолактон, обладающий сильней-

«падающей струи» (рис.3.10) культуральная жидкость по трубе, соединяющей дно реактора с его верхней частью, подается с помощью насоса 1 в сопла на крышке аппарата. Пузырьки воздуха захватываются жидкостью, струящейся сверху вниз в полости биореактора.

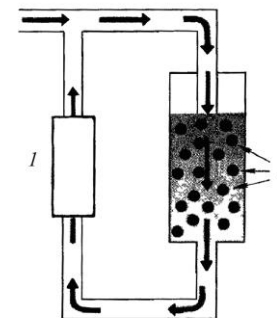


Рисунок.3.10 – Циркуляционный биореактор с твердой насадкой:
1 – насос, 2 – частицы твердой насадки

Аппараты циркуляционного типа часто заполняют твердыми частицами (насадкой). Такие частицы улучшают перемешивание в биореакторе, при длительном непрерывном культивировании препятствуют обрастанию его стенок, а также способствуют диспергированию воздуха в жидкости. Клетки растут в виде пленки на поверхности твердых частиц песка, кусков обожженной глины, гранул полимерных материалов. Прикрепление к твердой поверхности стимулирует развитие многих организмов, в частности грибов. При получении микробной массы на основе сельскохозяйственных отходов используют насадку из упругих полимерных частиц, рыхло заполняющих полость аппарата. Частицы содержат поры и полости. По окончании биотехнологического процесса частицы «выжимают», при этом собирают выдавленную биомассу, а частицы вновь загружают в биореактор.

Таким образом, по способам перемешивания и аэрации различают биореакторы трех основных типов, каждый из которых допускает многообразные варианты. Несмотря на то, что определенное предпочтение

дополнен диффузором, нижний обрез которого находится непосредственно над барботером (рис.3.9).

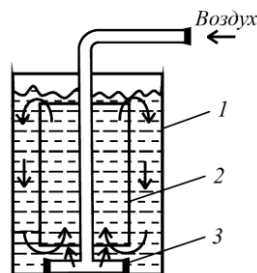


Рисунок 3.9 – Эрлифтный биореактор:
1 – корпус, 2 – диффузор, 3 – барботер

Столб жидкости внутри диффузора «расталкивается» пузырьками воздуха, плотность ее уменьшается, а объем увеличивается. Жидкость переливается через верхний край диффузора вниз, что приводит к перемешиванию и аэрации объема реактора вне диффузора.

На пневматическом перемешивании основаны многие колонные биореакторы, разделенные горизонтальными перегородками на этажи. Металлические горизонтальные перегородки имеют узкие отверстия. Основное назначение перегородок – интенсификация аэрации и перемешивания. Перегородки с отверстиями позволяют также бороться с укрупнением газовых пузырьков по мере их продвижения вверх, поэтому они приобретают особое значение для аппаратов большой высоты. Таким путем уменьшается также угроза избыточного пенообразования в реакторе.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием. Биореакторы циркуляционного (гидродинамического) типа содержат устройства (насосы, эжекторы), создающие направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос для циркуляции культуральной жидкости может соседствовать с барботером (сочетание пневматического и циркуляционного перемешивания). В аппаратах типа

шим бактерицидным действием и легко гидролизующийся далее в абсолютно нетоксичную молочную кислоту. Химическая стерилизация питательных сред не нашла промышленного применения, однако в ряде случаев удачно используется в лабораторных и опытных условиях.

Нельзя отнести к распространенным и метод стерилизующей фильтрации. Однако это объясняется не недостатками самого способа, а только трудностями технологического порядка. Метод основан на способности полупроницаемых мембран с крупными порами (типа микрофильтрационных мембран) пропускать жидкую фазу и задерживать (концентрировать) клетки микроорганизмов. В принципе метод стерилизующей фильтрации является идеальным средством стерилизации лабильных, в том числе термически неустойчивых жидких и газовых сред, поскольку он может быть применен при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны. По мере создания более совершенных конструкций мембранных аппаратов с термостойкими мембранами, рассчитанными на длительную эксплуатацию, метод стерилизующей фильтрации приобретет более широкое применение в промышленной биотехнологии, в том числе в крупнотоннажных производствах.

3.2. Стадия поддержания чистой культуры и получения посевного материала

Характеристика микроорганизма-продуцента (продуктивность, скорость роста) является основой любого процесса промышленной микробиологии и определяет структуру промышленного производства. Недостаточное поддержание чистоты культуры может значительно снизить технологические и экономические показатели цеха, а в особо сложных случаях полностью исключить возможность дальнейшей промышленной эксплуатации штамма.

Таким образом, отделение чистой культуры является тем звеном в промышленном микробиологическом синтезе, которое ответственно за постоянное и надежное воспроизведение полезных свойств продуцента,

найденных или достигнутых в свое время в ходе лабораторных исследований. Поэтому такое отделение в любом цехе, где производится промышленный биосинтез, включает в себя как лабораторные операции по контролю и сохранению чистой культуры, так и маломасштабное культивирование для постоянной передачи штамма на стадию ферментации. По мере необходимости из отделения чистой культуры поступает заданная масса инокулята, идущая в производство, т.е. в отделение промышленной ферментации.

Функция отделения чистой культуры состоит в поддержании свойств культуры и выращивании посевных доз последовательно в колбах и бутылках на 10–20 л, находящихся на качалках или просто размещенных в термостатируемом помещении, и далее последовательно в ферментаторах объемом (с учетом необходимости) 10, 100, 300, 500, 1000, 3000 л.

Характерной особенностью микробиологического синтеза является наличие постоянной взаимосвязи и зависимости между культурой-продуцентом и необходимой для нее питательной средой. При прочих равных условиях предпочтение, естественно, отдается тому продуценту, который способен развиваться и давать продукт на недефицитных питательных средах, не требующих использования редких, дорогостоящих или технологически неудобных субстратов, в том числе и пищевых продуктов.

После выбора штамма-продуцента в отделении чистой культуры проводится большая исследовательская работа по оптимизации питательной среды и условий его выращивания, результаты которой включаются в технологический регламент, являющийся нормативным документом для работников промышленности. Однако в условиях производства может возникать и обратная задача, когда происходят сезонные изменения сырья, и предприятие вынуждено использовать в качестве компонентов питательных сред отходы и побочные продукты сельского хозяйства, пищевой промышленности и другие вещества, не характерные для данного производства. Это ставит задачу дополнительной адаптации

1 – корпус, 2 – полая мешалка, 3 – диффузор

Воздух поступает в среду культивирования через нижний конец ее вала. Вращение мешалки способствует диспергированию воздуха в жидкости. Хороший газожидкостный контакт в таком биореакторе обеспечивается также спиральной траекторией пузырьков газа. В аппаратах с полый мешалкой часто непосредственно над лопастями аэрирующей мешалки устанавливают диффузор – открытый снизу и сверху цилиндр, который делит объем биореактора на два отсека – внутренний и внешний по отношению к стенкам диффузора. Диффузор усиливает разрежение, создаваемое при вращении мешалки в верхней части аппарата, где поверхность жидкости приобретает вид глубоко вогнутого мениска и тем самым способствует дополнительному подосу воздуха сверху (самовсасывающий эффект мешалки) и циркуляции жидкости в вертикальной плоскости аппарата.

Аппараты подобного типа широко применяются в производстве кормовых дрожжей, спирта и в других производствах с использованием дрожжей. Диффузор может устанавливаться также в аппаратах с обычной (не полый) мешалкой и барботажной аэрацией. В этом случае диффузор также способствует аэрации и перемешиванию, позволяя ограничиться одним ярусом лопастей мешалки.

Аппараты с механическим перемешиванием – наиболее распространенная конструкция в современной микробиологической промышленности.

Аппараты с пневматическим перемешиванием. В аппаратах пневматического типа мешалка отсутствует, перемешивание жидкости осуществляется пузырьками газа. Простейший аппарат подобного типа – барботажная камера, в которой распыленный барботером воздух, поднимаясь снизу вверх, перемешивает культуральную среду.

Скорость массопередачи между газом и жидкостью в таком аппарате намного ниже, чем в аппаратах с механическим перемешиванием. Для преодоления этого недостатка вводятся модификации. Классический, так называемый эрлифтный (*air lift* – подъем воздуха) аппарат

по всему объему. Иногда отражательные перегородки неприменимы, поскольку они обрастают микроорганизмами, в частности мицелиальными грибами, что резко ухудшает условия аэрации и перемешивания в аппарате. Для выращивания грибов используют мешалки с плоскими лопастями, не разрывающими мицелий.

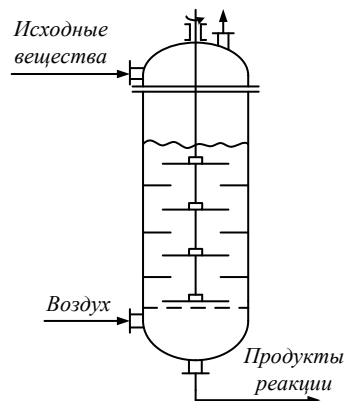


Рисунок 3.7 – Аппарат с механическим перемешиванием

Аэрация может осуществляться путем барботаж – подачи воздуха снизу через барботер – горизонтальную трубку с отверстиями.

В некоторых аппаратах используется полая мешалка (рис 3.8).

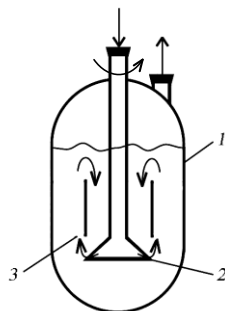


Рисунок 3.8 – Аппарат с полой мешалкой

продуцента к особенностям конкретной среды и одновременно уточнения состава среды и ее дополнительной оптимизации. Возможны, в принципе, и другие случаи, когда необходимо сменить продуцент и использовать другой штамм из коллекции завода.

Все это делает роль микробиологической службы завода и отделения чистой культуры в цехе очень сложной и ответственной. Приготовление посевного материала, как было отмечено, зависит от вида продуцента, его физиолого-биохимических особенностей и состоит из нескольких последовательных этапов: исходная культура (в пробирке) → выращивание на агаризованной среде (в пробирках) → выращивание в колбах на качалке на жидкой среде (одна – две стадии) → выращивание в посевном аппарате – инокуляторе (один или несколько) → накопление культуры микроорганизмов в малом ферментаторе → посевной материал.

На рис. 3.5 показана схема приготовления посевного материала, применяемая в производстве дрожжей на предельных углеводородах нормального строения – *n*-парафинах нефти.

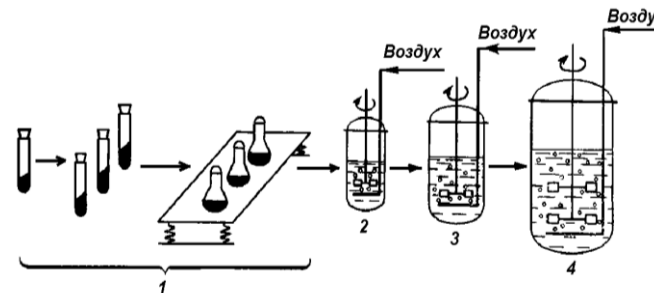


Рисунок 3.5 – Технологическая схема приготовления посевного материала

Выращивание посевного материала производится по следующим стадиям: 1 – получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода; 2 – выращивание посевного материала в малом посевном аппарате (емкостью 300 л); 3 – выращивание

дрожжей в большом посевном аппарате (емкостью 3200 л); 4 – накопление культуры дрожжей в малом ферментаторе (емкостью 50 м³).

Первая стадия выращивания посевного материала осуществляется в заводской лаборатории. Исходную культуру размножают на агаризованной среде в пробирке в стерильных условиях при оптимальных составе питательной среды и режиме выращивания (рН, температура, длительность).

Выращенную культуру стерильно смывают водой с поверхности агаризованной среды в колбы емкостью 750 мл, содержащие 50–100 мл жидкой питательной среды. Колбы с культурой помещают на качалку, которая находится в термостатируемом помещении 28–30 °С.

Перемешивание культуры, которое осуществляется встряхиванием качалки (120–240 об/мин), интенсифицирует массообмен и увеличивает скорость роста культуры. Продолжительность выращивания культуры в колбах на качалке составляет 18–36 ч. Эту стадию выращивания необходимо контролировать по морфологическим показателям микроорганизма. Наилучшие результаты дает культура, которая находится в стадии физиологической зрелости в конце логарифмической фазы роста.

На второй стадии выращивания посевного материала готовую культуру из колб стерильно переносят в посевной аппарат (инокулятор), в который предварительно вносят парафины и минеральные соли в определенных количествах. Посевной аппарат оснащен мешалкой, аэрирующим устройством, а также контрольно-измерительной аппаратурой для регулирования температуры, рН, уровня пены и т. д. Объем питательной среды в аппарате не должен превышать 60 % общего объема. Существенное значение имеет количество внесенного в аппарат посевного материала, так как при малом его количестве требуется более длительный период инокуляции. Поэтому в посевной аппарат обычно вносят 10–12 % посевного материала от объема питательной среды.

Во время приготовления посевного материала в аппаратах необходимо поддерживать оптимальный режим культивирования. Для кон-

противление диффузии питательных веществ и кислорода в клетку.

При перемешивании аэрируемой ферментационной среды устраняются все факторы, отрицательно влияющие на скорость переноса кислорода из воздуха к клетке: увеличивается площадь поверхности контакта фаз газ – жидкость, возрастает градиент концентраций кислорода между газовой и жидкой фазами, уменьшается сопротивление диффузионных газовой и жидкой пленок.

Аэрация и перемешивание одновременно с обеспечением растущей культуры кислородом способствуют удалению из среды образовавшихся газообразных метаболитов.

Все это обуславливает необходимость слаженной работы систем аэрации и перемешивания в биореакторах.

3.3.2. Системы перемешивания и аэрации биореакторов

По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием.

Аппараты с механическим перемешиванием. Эти аппараты имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и лопастей (обычно 6, реже 8) различной формы (прямых или изогнутых) – (рис.3.7).

Эффективное перемешивание жидкости в больших объемах обеспечивается только в том случае, если мешалки многоярусны, лопасти расположены в несколько этажей. При высоком числе оборотов мешалки образуется центральный водоворот перемешиваемой жидкости.

Среда начинает вращаться с той же скоростью, что и мешалка, и недостаточно перемешивается. Чтобы этого избежать, устанавливают отражательные перегородки – узкие металлические пластины, прикрепленные к внутренним стенкам реактора. Эти перегородки предотвращают возникновение водоворота вокруг вращающейся мешалки, переводя круговое движение жидкости в вихревое, равномерно распределенное

такого перехода достаточно сложен и имеет различные теоретические объяснения.

Наиболее разработанной является теория стационарной газовой пленки. В соответствии с этой теорией, перенос кислорода из газовой фазы в клетку микроорганизма представляет собой сложный физико-химический процесс, в котором можно выделить несколько фазовых переходов. На рис.3.6. показана упрощенная схема этого процесса.

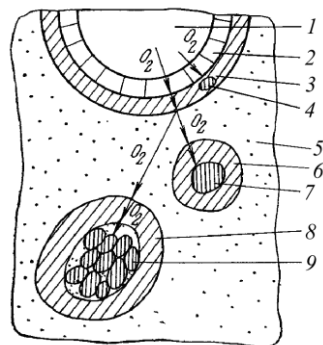


Рисунок 3.6 – Схема переноса кислорода из пузырька воздуха к поверхности микробных клеток и агломератам клеток:
1 – пузырек воздуха; 2 – газовая пленка; 3, 6, 8 – жидкие пленки;
4, 7 – микробная клетка; 5 – культуральная жидкость; 9 – агломерат микробных клеток

Первый переход – фазовый – это перенос кислорода из газовой фазы в жидкую, т.е. абсорбция газообразного кислорода питательной средой. Скорость процесса на этой стадии зависит от сопротивления пограничных газовой (2) и жидкой (3) пленок, а также от площади поверхности контакта фаз и градиента концентраций кислорода в газовой и жидкой фазах.

На втором переходе – растворенного кислорода из жидкости в клетку – необходимо преодолеть сопротивление гидратной диффузионной пленки, образующейся на наружной поверхности клетки (6) и агломерата клеток (8). Эта пленка имеет большую вязкость и оказывает со-

троля регулярно отбирают пробы и проводят их микробиологический и биохимический анализ. Культивирование продолжают до тех пор, пока в среде не накопится дрожжей 14–20 г/л (в расчете на сухую массу). Обычно процесс заканчивается за 12–14 ч.

Третья стадия культивирования посевного материала осуществляется в посевном аппарате объемом 3,2 м³. Для этого все содержимое малого инокулятора перекачивается в аппарат большего объема, в котором находится простерилизованная питательная среда. Коэффициент перехода от одного аппарата к другому зависит от конкретных условий выращивания каждой культуры микроорганизмов. Если этот переход осуществляется в фазе экспоненциального роста, то коэффициент перехода по отношению к объему следующего аппарата равен обычно 10. Процесс выращивания длится 12–14 ч.

Четвертая стадия процесса осуществляется в аппарате объемом 50 м³. Перед приемом дрожжевой суспензии с предыдущей стадии в аппарате готовят питательную среду путем подачи парафина, растворов питательных солей и микроэлементов. Среду доводят до оптимальных значений pH и температуры, перекачивают засевные дрожжи с предыдущей стадии и начинают процесс выращивания при непрерывной аэрации и перемешивании. Процесс накопления дрожжей длится 10–12 ч. Когда концентрация абсолютно сухих дрожжей (АСД) в среде составит 14–17 г/л, дрожжевую суспензию можно подавать в производственные ферментаторы. Полученный посевной материал подвергают тщательному микробиологическому и биохимическому контролю, так как от его активности и чистоты зависит дальнейший производственный цикл.

3.3. Стадия ферментации

3.3.1. Особенности процессов тепломассопереноса в биореакторах

Стадия ферментации является центральной в промышленном микробиологическом производстве. Под ферментацией понимают всю совокупность последовательных операций от внесения инокулята в за-

ранее приготовленную и термостатированную среду и до завершения процессов роста, биосинтеза вследствие истощения питательных элементов среды.

Биотехнологические процессы принципиально не отличаются от процессов химического синтеза. Для них характерны такие этапы, как загрузка субстратов для реакций синтеза, превращения субстратов, отделение и очистка целевого продукта. Процессы обоих типов могут быть периодическими и непрерывными. Существуют и общие принципы создания аппаратуры: это в первую очередь, *принцип масштабирования* – поэтапного увеличения объема аппаратов и *принцип однородности* физико-химических условий – температуры, pH, концентрации растворенных веществ, включая кислород и другие газы – во всем объеме аппарата. Учитывая сходство химических и биохимических процессов, первоначально делались попытки использовать химические реакторы для реализации процессов микробиологического синтеза.

Это, однако, порождало серьезные проблемы. Специфика биотехнологических процессов состоит в том, что в них принимают участие живые клетки. Это оказывает существенное влияние на процессы *массопередачи* – обмена веществ между различными фазами (например, перенос кислорода из газовой фазы в жидкую) и *теплообмена* – перераспределения тепловой энергии между взаимодействующими фазами – а также накладывает дополнительные ограничения на системы перемешивания и системы теплообмена биореакторов.

Система перемешивания служит для обеспечения однородности условий в аппарате, эффективной массопередачи между водной фазой в биореакторе и пузырьками газа, между культуральной жидкостью и культивируемыми клетками, а также между различными слоями жидкости.

Расчет системы перемешивания требует ясного понимания особых свойств среды в биореакторе. Клетки, часто соединенные в длинные цепочки, и особенно гифы грибов значительно увеличивают вязкость среды. Помимо этого, жидкость, содержащая нитевидные образования,

как бы приобретает жесткую арматуру. Усилия ниже определенной (пороговой) величины, приложенные в такой жидкости (например, давление лопастей мешалки), не вызывают ее перемешивания. Подобные свойства не характерны для жидких сред, не содержащих биообъекта, поэтому в биотехнологии предъявляются особые требования к системе перемешивания, в частности, приходится резко повышать мощность мешалки.

Повышение мощности и соответственно ускорение вращения мешалки создают другую проблему. Значительные усилия, приложенные к жидкости, могут повлечь за собой угнетение роста биообъекта, снижение эффективности синтеза целевого продукта, повреждение и гибель клеток.

Существенные различия между биотехнологическими и химикотехнологическими процессами касаются массопередачи между газовой и жидкой фазами в реакторе. Многие биотехнологические процессы относятся к числу *аэробных* – они требуют для своего осуществления аэрации, т. е. снабжения кислородом. Для аэрации культуральной среды используют обычный воздух или воздух, обогащенный кислородом. В ходе метаболических процессов выделяются газообразные продукты, в первую очередь CO₂, которые подлежат удалению. Процессы, протекающие без доступа кислорода (анаэробные), требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности.

Снабжение культуральной среды кислородом осуществляется с помощью специальных установок – аэраторов, которые должны функционировать эффективно, надежно и в то же время экономично. Кислород плохо растворим в воде: его равновесная концентрация в питательных средах при (26–30) °C близка к 0,21 моль/м³ (0,0007 %). В то же время кислород относится к числу быстро расходуемых субстратов, и поэтому его запас в жидкости без подпитки исчерпывается за несколько секунд. Для того чтобы обеспечить клетки микроорганизмов кислородом, необходимо интенсифицировать процесс перехода кислорода из воздуха в питательную среду, а затем из среды – в клетку. Механизм

В современных разработках прослеживается тенденция к использованию в качестве носителей синтетических крупнопористых материалов, своеобразных «губок», впитывающих клеточную массу. Величина пор при этом должна в несколько (4–12) раз превышать размер клеток. Распространенным губчатым материалом является полиуретан, образующий твердую «пену» с открытыми ячейками. Этот материал в виде мелко нарезанных частиц помещают в биореактор с клетками. Клетки, проникая в ячейки носителя, быстро растут. Такая система применяется в очистке сточных вод. В общем случае эффективная очистка промышленных сточных вод возможна лишь при работе с иммобилизованными микроорганизмами. При этом используют их пространственное разобщение для направленного разрушения того или иного соединения с помощью специально подобранных штаммов. В очистных сооружениях устанавливают специальные каркасы с гибкими ершами из стекловолокна, на каждом из которых адсорбированы специфические микроорганизмы, способные разрушать определенное загрязняющее вещество. Такие системы обезвреживают цианиды, фенолы и другие соединения в 2–10 раз быстрее, чем без иммобилизации, снижают себестоимость очистки, улучшают качество очищенной воды.

Для иммобилизации биокатализатора путем физической адсорбции без химической сшивки характерно слабое влияние носителя на свойства биокаталитической системы. Ферменты сохраняют свою природную активность, а клетки — жизнеспособность. В то же время непрочный характер связи носителя с ферментом (клеткой) ведет к их десорбции, снижающей надежность метода.

Более прочной является *химическая сшивка* – химическое присоединение биокатализатора к носителю. Для этих целей широко применяют реакции, ведущие к образованию пептидных связей между аминокислотными группами биокатализатора и карбоксильными группами носителя или, наоборот, между карбоксильными группами катализатора и аминокислотными группами носителя.

Иммобилизация путем химической сшивки отличается более вы-

отвода избыточной теплоты, выделяемой в процессах жизнедеятельности.

Теплообмен описывается уравнением, связывающим теплоту Q , переданную в единицу времени от одной фазы к другой (в рассматриваемом случае – между внутренним объемом реактора и окружающей средой или между этим объемом и системой теплообмена), с площадью поверхности теплообмена F и межфазной разностью температур ΔT :

$$Q = KF\Delta T.$$

Коэффициент теплопередачи K соответствует количеству теплоты, которая передается в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1 °С.

Из уравнения следует, что повысить скорость передачи теплоты между внутренним объемом и системой теплообмена, увеличить эффективность работы этой системы можно путем: 1) повышения коэффициента теплопередачи; 2) увеличения поверхности теплообмена; 3) увеличения разности температур. Первые два пути связаны с инженерно-конструкторскими разработками. Коррозия стенок биореактора или их загрязнение снижают коэффициент теплопередачи. Отсюда вытекает необходимость изготовления аппарата из неподверженных коррозии материалов и его поддержания в чистоте. Что касается разности температур между реактором и теплообменными устройствами, то важный путь ее повышения состоит в использовании термофильных микроорганизмов и их ферментов, использовании в качестве охлаждающего агента воды с низкой температурой (артезианскую или пропущенную через холодильную установку). Для более глубокого охлаждения используют этиленгликоль, фреоны. Нагревающим агентом служит горячая вода или пар.

Технические способы передачи тепла в биореакторах

Различают два основных метода охлаждения (нагрева) среды в реакторе – прямой и косвенный.

Прямой метод используют для нагрева жидкости путем впуска горячего пара непосредственно в нагреваемую среду. Пар конденсирует-

ся, отдавая тепло, а конденсат смешивается с питательной средой. Обычно пар вводится через барботер в виде спирали, расположенной на дне реактора. Одновременно происходит перемешивание жидкости.

Преимущества метода:

- высокий коэффициент теплоотдачи теплоносителя (пара) – 5000–18000 Вт/м² °С;
- равномерность прогрева жидкости, так как конденсация пара происходит при постоянной температуре.

Недостатки метода:

- тепловой удар по микроорганизмам в зоне введения пара, что может привести к их гибели;
- распад термолабильных компонентов питательной среды;
- разбавление среды за счет конденсата, а следовательно, снижение концентрации питательных веществ.

Способ имеет ограниченное применение, главным образом, для очистки сточных вод, когда требуется обеззараживание стоков, т.е. инаktivация патогенной микрофлоры под воздействием высоких температур.

При *косвенном методе* теплообмена передача тепла от одного теплоносителя к другому осуществляется через непроницаемую перегородку.

Теплопередающая поверхность может иметь различные геометрические формы (змеевик, рубашка, трубка) и располагаться как снаружи, так и внутри аппарата. Типы теплообменных устройств представлены на рис.3.10.

В биотехнологии распространен *наружный* способ обогрева или охлаждения через рубашку – металлический кожух, заполненный теплоносителем. Основным преимуществом этого типа теплообменного устройства является освобождение внутреннего пространства аппарата от конструктивных элементов, что значительно облегчает эксплуатацию реактора и способствует его надежной герметизации.

Для интенсификации процесса теплообмена используют секцио-

ристые стеклянные шары, которыми затем заполняют колонну биореактора. Через реактор пропускают очищенный раствор крахмала. Процесс протекает непрерывно; реактор работает несколько месяцев, пока из-за неизбежных потерь не снизится концентрация амилаз на поверхности носителя.

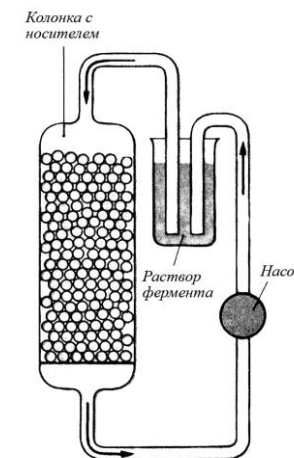


Рисунок 3.14 – Получение адсорбционно-иммобилизованных ферментов динамическим способом

Аналогичными методами иммобилизуют клетки микроорганизмов, хотя сама идея закрепления клеток появилась значительно позже, чем идея закрепления ферментов. При этом активность закрепленных клеток примерно в 10 раз превышает активность свободных клеток. В настоящее время действует несколько крупных опытных установок для получения спирта с помощью иммобилизованных дрожжей, закрепленных на пористых полимерных шарах. Шары помещают в колонный биореактор, сверху подают раствор сахара, а снизу отводят спирт. Аппарат работает непрерывно длительное время (не менее 4 месяцев); его производительность в 10 раз выше, а себестоимость продукции значительно ниже, чем при использовании незакрепленных дрожжей.

ки. Иммобилизация осуществляется за счет диффузии фермента к поверхности носителя с последующей адсорбцией. После отмывки неадсорбированного фермента препарат иммобилизованного биокатализатора готов к использованию. Способ обеспечивает равномерное заполнение поверхности носителя адсорбированным ферментом (рис 3.13).

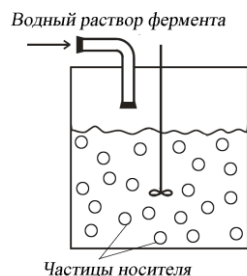


Рисунок 3.13 – Получение адсорбционно-иммобилизованных ферментов статическим способом с перемешиванием

- *динамический – метод нанесения в колонке:* через колонку, заполненную носителем, с помощью насоса прокачивают в направлении сверху вниз раствор фермента в режиме непрерывной циркуляции (рис. 3.14).

Метод обладает тем преимуществом, что позволяет проводить нанесение фермента, промывку, а затем и сам ферментативный процесс в одной и той же колонке без дополнительных манипуляций с носителем.

В настоящее время адсорбционная иммобилизация благодаря целому ряду преимуществ является наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментов промышленного значения.

Примером промышленного применения иммобилизации ферментов может служить широко практикуемая ныне технология получения виноградного сахара (глюкозы) из крахмала. Амилазы, расщепляющие крахмал, не вводят в реактор вместе с сырьем, а пропитывают ими по-

нированную рубашку со спиральной перегородкой, а также тангенциальный ввод теплоносителя. Однако применение устройств наружного теплообмена ограничено размерами аппарата. Целесообразно применять рубашки в реакторах с рабочим объемом не более 1 м^3 , так как при большем объеме снижается удельная поверхность теплообмена и увеличивается металлоемкость конструкции из-за необходимости увеличивать размеры теплообменной поверхности, толщину стенок аппарата.

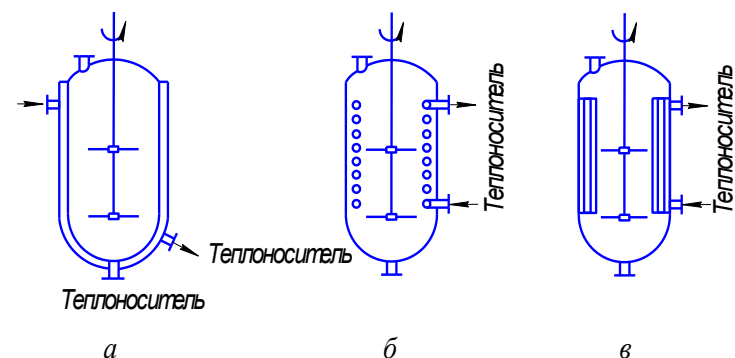


Рисунок 3.10 – Типы теплообменных устройств в биореакторах:

а – рубашка; б – змеевик; в – трубчатка

В качестве внутренних теплообменных устройств в реакторах чаще всего применяют змеевики. В аппаратах объемом менее 5 м^3 используют один змеевик, расположенный в центральной части, в аппаратах большого объема – несколько змеевиков, расположенных по периферии.

Другим типом внутреннего теплообменного устройства являются вертикальные трубчатые перегородки, размещенные радиально вблизи стенок аппарата. По сравнению со змеевиками они имеют больше сварных соединений, поэтому более трудоемки и сложны в изготовлении, недостаточно надежны в эксплуатации, поэтому используются реже.

Конструкции внутренних теплообменных устройств должны обеспечивать доступность и простоту осмотра, чистки и стерилизации

биохимического реактора, а также предотвращение вибрации при перемешивании путем жесткого крепления к корпусу аппарата. Следует отметить, что расположение теплообменных устройств, особенно нескольких, внутри реактора ухудшает условия перемешивания и теплообмена в его реакционном объеме. Кроме того, наличие патрубков для ввода и вывода теплоносителя из змеевика, которые могут располагаться на крышке, днище или стенках корпуса аппарата, снижает надежность герметичности аппарата.

Технологические требования к скорости теплоотвода очень жесткие из-за узкого температурного оптимума роста культуры, который укладывается обычно в интервал 2–3 °. Охлаждение реактора оборотной водой через змеевики, рубашки и другие устройства осложняется в микробиологической промышленности очень малой разностью температур между содержимым биореактора (32–34 °С для большинства мезофильных процессов) и охлаждающей водой, которая поступает в теплообменные устройства с градирни с температурой более 20 °С, а в жаркое время года – еще выше. Это заставляет создавать в биореакторе развитую поверхность теплообмена, постоянно бороться со шламообразованием и обрастанием поверхности теплообменных устройств, а также увеличивать скорости движения жидкостей у обеих поверхностей теплообменника за счет большого объема прокачиваемой внутри труб или рубашек охлаждающей воды и интенсивной циркуляции жидкости, находящейся в биореакторе.

3.4. Стадия выделения и очистки целевых продуктов биосинтеза

Продукты микробиологического синтеза, будь то клетки или метаболиты, поступают из биореактора в виде водных суспензий или растворов, имеющих низкую концентрацию основного компонента. Например, содержание биомассы клеток в производстве дрожжей составляет 5–10 %, в производстве бактериальных препаратов – не более 1–2 %. Применяемый в каждом конкретном биопроцессе метод выделе-

зование; v – адсорбция на плоском носителе; g – поперечная сшивка; d – включение в гель

Иммобилизация путем адсорбции или химической сшивки. Иммобилизация ферментов путем адсорбции на нерастворимых носителях отличается исключительной простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем.

Для получения иммобилизованных ферментов используется огромное число носителей. Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть применены в качестве носителей, следующие: 1 – высокая химическая и биологическая стойкость; 2 – высокая механическая прочность (в первую очередь, по отношению к истиранию); 3 – достаточная проницаемость для фермента и субстратов, большая удельная поверхность, высокая вместимость, пористость; 4 – возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран, труб, листов и т. д.); 5 – легкое переводение в реакционноспособную форму (активация); 6 – высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность проведения реакции связывания фермента с носителем в водной среде; 7 – невысокая стоимость. Носители, удовлетворяющие одновременно всем этим требованиям, практически отсутствуют, и это обуславливает широкий набор применяемых для иммобилизации материалов. Обычно их используют в виде порошков, мелких шариков или гранул.

При иммобилизации путем адсорбции фермент фиксируют на поверхности неорганических (силикагель, пористое стекло, песок, обожженная глина, керамика) или органических (целлюлоза, ионообменные смолы, полиэтилен, полистирол) носителей. Механизм и прочность связей между биокатализатором и носителем разнообразны. Главную роль играет электростатическое взаимодействие носителя и поверхности клеток. На практике для получения адсорбционно-иммобилизованных ферментов применяются следующие способы:

- *статический способ с перемешиванием* состоит в том, что носитель вносят в водный раствор фермента и полученную смесь непрерывно перемешивают с помощью магнитной или механической мешал-

важнее возможность непрерывного режима с использованием известного в химической технологии принципа взаимодействия подвижной и неподвижной фаз. Подвижная фаза – раствор, суспензия, эмульсия реагентов – протекает через реактор, заполненный насадкой с иммобилизованным на носителе биокатализатором (неподвижная фаза).

Фактором, способствующим длительному, в том числе непрерывному, функционированию иммобилизованных биокатализаторов, является их повышенная стабильность, сохранение активности в течение длительного времени как при хранении, так и в ходе биотехнологического процесса.

Принципы иммобилизации ферментов распространились и на клетки.

3.6.1. Методы иммобилизации биокатализаторов

Длительность сохранения каталитической активности и свойств биокатализаторов определяется правильностью выбора метода и условий проведения иммобилизации. Существует несколько принципиально различных методов связывания катализаторов с носителем: методы адсорбции и химического связывания на поверхности, механического включения, химического присоединения (рис. 3.12).

Специфика каждого из них должна быть учтена при выборе предпочтительного метода иммобилизации и конкретных условий его реализации.

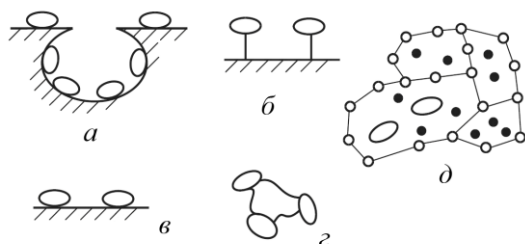


Рисунок 3.12 – Основные методы иммобилизации ферментов:
а – адсорбция на крупнопористом носителе; б – ковалентное свя-

ния продукта определяется его физико-химическими свойствами (молекулярной массой, растворимостью), масштабом производства и стоимостью продукта; зависит он также от начальных свойств культуральной жидкости (вязкости, количества примесей и т.д.), от требуемой чистоты и конечной формы продукта (концентрированный раствор, порошок, кристаллическое вещество).

В большинстве промышленных микробиологических производств в качестве первого этапа переработки культуральной жидкости производят отделение биомассы продуцента от жидкой фазы, которая далее также подвергается переработке, если она содержит метаболиты, представляющие практическую ценность.

В тех производствах, где целевым продуктом является биомасса клеток, культуральная жидкость (бесклеточная) не перерабатывается, а лишь подвергается очистке, позволяющей повторно использовать водную фазу и снизить образование сточных вод.

Способы отделения клеток от среды в значительной степени зависят от природы продуцента и определяются конечной целью производства. Различают *механические* (отстаивание, фильтрование, центрифугирование) и *теплотехнические* (выпаривание, сушка) способы выделения клеточной массы из культуральной жидкости. В зависимости от конечной цели выбирают различные сочетания этих способов. При выборе схемы концентрирования и извлечения целевого продукта проводят экономическую оценку технологии с учетом товарной формы биопрепаратов, концентрации микроорганизмов в культуральной жидкости и др.

К примеру, в производстве хлебопекарных дрожжей интерес представляют лишь сами клетки, поэтому на стадии выделения ставится задача возможно более полного отделения клеток от жидкой фазы. По окончании выращивания дрожжевых клеток их необходимо как можно быстрее выделить из культуральной среды, так как длительное пребывание дрожжей в бражке приводит к ухудшению их ферментативной активности.

Для получения брикетированных дрожжей применяют механические способы выделения клеток. Культуральную жидкость сначала подвергают 2–3 ступенчатой сепарации, разделяя на жидкость, практически лишенную дрожжей (бражку), и дрожжевое молоко с концентрацией дрожжевых клеток (300–700) г/л. Из дрожжевого молока клетки дрожжей выделяют фильтрованием на барабанных вакуум-фильтрах и получают пастообразную массу влажностью $\approx 75\%$. В дальнейшем массу, снятую с фильтра, подвергают прессованию и получают продукт с высоким содержанием живых клеток, имеющих хорошую хлебопекарную активность («подъемную силу»).

Однако срок хранения прессованных дрожжей – не более 12 суток, в то время как сухие дрожжи могут сохраняться в течение 5 месяцев.

Для получения пищевых дрожжей в сухом виде применяют один из теплотехнических методов концентрирования продукта – сушку. В процессе сушки влажность дрожжей снижается до 8–10 %. Основное требование, предъявляемое к технологии обезвоживания дрожжей – это сохранение их жизнеспособности. Поскольку дрожжи, как и все микроорганизмы, термолабильны, то сушку следует проводить в мягком режиме, т.е. при невысокой температуре и небольшой продолжительности.

Используют несколько способов сушки: в малоподвижном слое, во взвешенном состоянии, распылением, в условиях остаточного давления. Во всех случаях сушку осуществляют нагретым воздухом. Однако температура теплоносителя различна и зависит от конструкции сушилки: в вакуумной сушилке $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, в камерной и ленточной сушилках $45\text{--}48\text{ }^{\circ}\text{C}$, в распылительной $140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Особенно сложные проблемы решаются технологами при выделении и очистке целевых метаболитов: аминокислот, ферментов, витаминов. В таких случаях часто приходится использовать очень сложный и, как правило, не типовой, а конкретный (для данного продукта) набор стадий, позволяющих выделить вещество достаточной степени чистоты. Биомассу клеток предварительно выделяют из культуральной жидкости

проведения несложных биохимических анализов. В 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии (США) был узаконен термин «иммобилизованные ферменты».

Иммобилизация фермента – это ограничение его подвижности таким образом, чтобы активный центр его молекулы не подвергался структурным изменениям и сохранял свою конфигурацию, а следовательно, и работоспособность (каталитическую активность) в течение длительного времени (рис. 3.11).

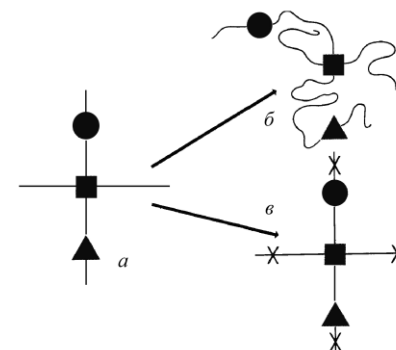


Рисунок 3.11 – Активный центр фермента (а) и его изменения, приводящие к потере активности (б) или стабилизации путем иммобилизации (в)

При иммобилизации ферменты из разряда гомогенных катализаторов (находящихся в той же фазе, что и субстраты реакции) переходят в разряд гетерогенных (образующих особую фазу, отделенную от реагентов). Фермент и реагенты могут быть разделены, что позволяет: а) в нужный момент остановить реакцию; б) регенерировать фермент после окончания реакции и использовать его для нового цикла биотехнологического процесса; в) получить продукт реакции без примеси фермента, что имеет особое значение для пищевой и фармацевтической промышленности.

Процесс можно многократно реализовывать в периодическом режиме с использованием одного и того же ферментного препарата. Еще

производить ее наполнение и укупорку в асептических условиях. Последнее, как правило, достигается применением специальных автоматизированных линий фасовки и тщательным химическим и микробиологическим контролем производства.

3.6. Понятие об иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов

Широкие перспективы для промышленной реализации биотехнологических процессов открылись в результате создания нового типа биокатализаторов, так называемых иммобилизованных ферментов.

Долгое время использование ферментов в различных областях практической деятельности человека: в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и других отраслях промышленности, в медицине, сельском хозяйстве – сдерживалось по ряду причин. Во-первых, они неустойчивы при хранении, а также при различных воздействиях, особенно тепловых. Во-вторых, многократное использование ферментов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции; по этой же причине продукт, загрязненный ферментом, не может соответствовать предъявляемым требованиям по чистоте.

Начало целенаправленных исследований, ориентированных на создание стабилизированных ферментных катализаторов, относится к середине прошлого столетия. Следует отметить, что в природе: почвах, горных породах, на поверхности растений – микроорганизмы существуют в основном в закрепленном состоянии. Первые попытки применить иммобилизованные микроорганизмы были сделаны еще 150 лет назад в Германии, когда закрепленные на буковой стружке бактерии использовали для производства уксуса. Было замечено, что иммобилизованные клетки приобретают высокую стабильность и могут использоваться в процессе биосинтеза в течение нескольких месяцев и даже лет.

Особое внимание специалистов привлекли иммобилизованные клетки в конце 60-х – начале 70-х годов XX столетия, когда они стали успешно применяться не только для производства препаратов, но и для

осаждением, добавляя известь или другие твердые компоненты, осадком которых захватываются клетки. Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием.

Переработка полученной бесклеточной культуральной жидкости включает следующие стадии:

- *первичное выделение продукта* каким-либо из методов: экстракцией растворителями (чаще всего спиртом), осаждением химическими реактивами либо применением мембранной технологии, прежде всего процессов микрофильтрации и ультрафильтрации через полимерные мембраны со специально подобранным размером пор (например, мембрана с диаметром пор 5–45 нм полностью отделяет от культуральной жидкости белковые молекулы). Этим методом удастся полностью удалить клетки из культуральных жидкостей, концентрируя их и получая фильтрат, составляющий 90 % и более (по объему) от исходной жидкости и абсолютно не загрязненный клетками.

После первичного выделения продукта его концентрация возрастает в ≈ 10 раз по сравнению с исходной жидкостью.

- *дальнейшее концентрирование* продукта и очистка от примесей. Здесь могут использоваться фракционное осаждение, адсорбция, хроматография.

Разделение веществ путем хроматографии связано с их неодинаковым распределением между двумя несмешивающимися фазами. Различают хроматографию на бумаге, пластинках, колонках. При хроматографии на бумаге или на пластинках одной из несмешивающихся фаз служит движущийся растворитель, например, бутанол, а другой, неподвижной фазой – волокна бумаги или частицы покрывающего пластинку силикагеля или другого материала. При колоночной хроматографии подвижная фаза – текущий через колонку растворитель, неподвижная – заполняющий колонку адсорбент, чаще всего гранулированный гель. Разделяемая смесь вводится в контакт с подвижной и неподвижной фазами. В промышленных условиях применяется колоночная хроматография.

Концентрация продукта на этом этапе возрастает до 80 %.

- *окончательная очистка* продукта. После этой операции продукт готов к отправке потребителю. Используют отгонку органического растворителя и последующее высушивание продукта. Осуществляют сушку распылением или в барабане. Концентрация продукта достигает 90–100 %.

3.5. Получение товарных форм продуктов микробного синтеза

Последней стадией технологического цикла в микробиологическом синтезе является получение товарной формы продукта. В зависимости от конечного вида целевого продукта его товарная форма может представлять собой либо биомассу клеток, либо достаточно высокоочищенный препарат, отвечающий ряду специальных требований, например асептики.

В производстве прессованных хлебопекарных дрожжей товарный продукт получают путем формования пастообразной дрожжевой массы в виде прямоугольных брусков массой 1000, 500, 100, 50 граммов. Брикететы заворачивают в специальную бумагу. Формование и фасовку прессованных дрожжей осуществляют в автоматических линиях, состоящих из формовочной машины и фасовочно-упаковочного автомата для резки и упаковки дрожжей. Упакованные бруски укладывают в деревянные чистые, сухие ящики и отправляют на хранение в холодильные камеры, где поддерживается температура 1–4 °С и влажность воздуха не менее 82 %. Низкая температура способствует замедлению процессов жизнедеятельности в дрожжевых клетках и лучшей сохранности продукта.

Трудность разделения многокомпонентных разбавленных растворов и суспензий, являющихся первичным продуктом промышленной биотехнологии, в ряде случаев заставляет отказаться от выделения основного компонента. Это относится, в частности, к производству аминокислоты – лизина. К сожалению, технология получения кристаллической формы лизина в удобном для хранения (негигроскопичном) виде требует дальнейшего совершенствования, что оправдывает выпуск кон-

центратов с невысоким содержанием основной аминокислоты.

Промышленность выпускает жидкий концентрат лизина и так называемый кормовой концентрат лизина (ЖКЛ и ККЛ соответственно). В первом случае продуктом является просто упаренная бесклеточная культуральная жидкость, в которой концентрация сухих веществ в жидкой фазе повышается от 4–6 % до 40 %, а во втором – после выпарки к жидкой фазе добавляют какой-либо кормовой наполнитель, например, отруби, и полученную пасту сушат на ленточных сушилках. В отличие от быстро портящегося и нетранспортабельного ЖКЛ сухой концентрат хранится более продолжительное время и удобен в применении, однако низкое содержание лизина (15–20 %) делает его невыгодным при перевозках на большие расстояния. Понятно, что хотя оба вида концентратов содержат дополнительное, кроме лизина, количество полезных компонентов культуральной жидкости, перешедших в продукт при упаривании и сушке, гораздо эффективнее получать кристаллический лизин с высоким (> 95 %) содержанием основного вещества, а смесь других компонентов культуральной жидкости, имеющих высокую физиологическую активность, выпускать отдельно в качестве дополнительного продукта.

Стадия фасовки рассмотренных комплексных препаратов – БВК, ККЛ, ферментов технического назначения – заключается в помещении их в тару (мешки, барабаны и т. п.), размеры и тип которой определяются потребностями заказчика и свойствами продукта (его слеживаемостью, гигроскопичностью, стойкостью к загниванию и т. д.). Для целого ряда биопрепаратов, однако, этот вопрос решается значительно сложнее, поскольку биохимические продукты пищевого и особенно медицинского назначения (например, витамины) должны иметь заданную степень чистоты и очень часто – абсолютную стерильность. Кроме обычных приемов, направленных на повышение содержания основного вещества до значения, определяемого требованием ГОСТ, при фасовке и укупорке таких продуктов приходится использовать специальную технологию, позволяющую стерилизовать вещества и подготовленную для них тару и

дуктов разложения аминокислот невозможно, и они накапливаются в среде. Кроме того, в анаэробных условиях происходит *декарбоксилирование* аминокислот (т.е. их разложение с выделением CO_2). При этом образуются дурно пахнущие вещества: индол, скатол, фенол и др. При декарбоксилировании аминокислот образуются диамины; их производные являются трупными ядами, обладают ядовитым действием и могут вызвать отравление.

Возбудителями гниения в основном являются бактерии. К аэробным гнилостным бактериям относятся главным образом спорообразующие палочки *Bacillus subtilis* (рис. 4.5).

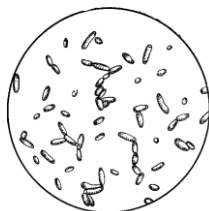


Рисунок 4.5 – *Bacillus subtilis* (сенная палочка)

К строгим анаэробам относятся споровые палочки *Clostridium putrificum*, *C. sporogenes* (рис 4.6).

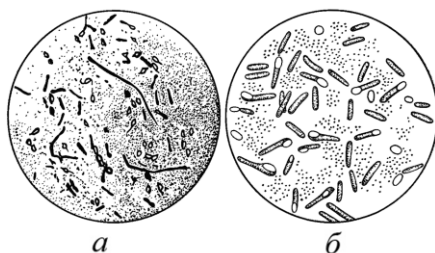


Рисунок 4.6 – Споровые палочки: а – *Clostridium putrificum*; б – *Clostridium sporogenes*

Значение процесса гниения. Гнилостные бактерии являются вре-

сокой эффективностью и прочностью связи, чем проведенная путем физической адсорбции.

Положительными качествами метода иммобилизации путем адсорбции являются: относительная дешевизна носителей, которым к тому же можно придать любую форму и обеспечить требуемую пористость; устойчивость адсорбентов к воздействию микроорганизмов.

Применение метода ограничивается недостаточно высокой прочностью связывания биокатализатора с носителем, вследствие чего происходит десорбция фермента. Это ведет к потере дорогостоящего катализатора и загрязнению конечного продукта.

Эти недостатки можно устранить при иммобилизации ферментов путем включения в гели.

Иммобилизация путем включения в полимерную структуру (гель)

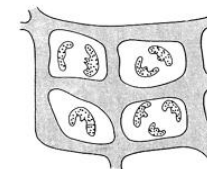


Рисунок 3.15 – Иммобилизация путем включения в полимерную структуру (гель)

Этим методом биокатализатор вносят в полимерную структуру: получают гранулы, пленки, волокна, несущие биокатализатор (рис 3.15).

Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель (рис. 3.16):

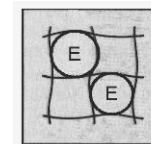


Рисунок 3.16 – Молекулы фермента в трехмерной сетке

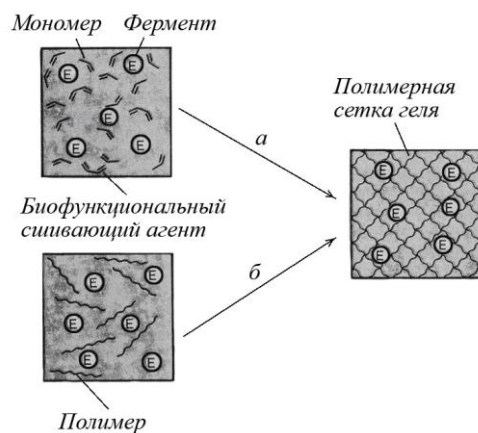
Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т. е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный «вклад» в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями.

Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть общего объема геля.

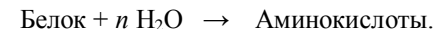
Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа. По одному из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента.

В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (т. е. содержащие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки (рис. 3.17, а)

По второму способу фермент вносят в раствор уже готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние (рис. 3.17, б).

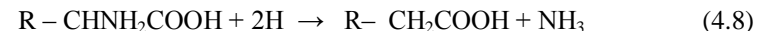
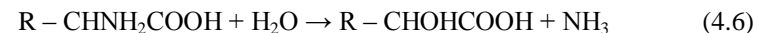


Белки, подобно другим высокомолекулярным соединениям, в неизменном виде внутрь бактериальной клетки проникнуть не могут и вначале подвергаются расщеплению вне клетки под влиянием микроорганизмов, обладающих протеолитическими ферментами, которые по характеру действия являются экзоферментами. Расщепление молекул белков начинается с их гидролиза при помощи ферментов протеаз по следующей схеме:



Дальнейшие превращения образовавшихся аминокислот различны. Они диффундируют внутрь микробных клеток и могут использоваться микроорганизмами либо в конструктивном обмене для биосинтеза белков клетки как источники углерода и азота, либо подвергаются дезаминированию или декарбоксилированию.

Дезаминирование приводит к отщеплению аминогруппы, из которой образуется аммиак и органические кислоты и спирты по уравнениям:



При разложении белков образуются муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, валериановая и другие кислоты и высокомолекулярные спирты.

Образовавшиеся продукты распада аминокислот претерпевают различные превращения в зависимости от вида бактерий и условий, в которых происходит процесс гниения.

В аэробных условиях кислоты полностью окисляются до H_2O и CO_2 (весь углерод белковых веществ выделяется в виде CO_2). Если в составе аминокислот содержится сера, то она при гниении выделяется в форме сероводорода или меркаптанов, обладающих запахом тухлых яиц.

В анаэробных условиях полное окисление промежуточных про-

Для повышения концентрации исходные растворы вымораживают до 20–30 %. Дальнейшее концентрирование до получения ледяной уксусной кислоты (98,0–99,8 %) проводят методом перегонки.

Кроме спиртового натурального уксуса производят винный уксус, когда субстратом для окисления служит вино, и яблочный уксус, когда используется яблочный сок.

4.1.2. Биохимическое превращение органических веществ, содержащих азот

Процессы превращения органических азотсодержащих веществ играют важную роль в производстве пищевых продуктов. Это, в первую очередь, гнилостные процессы.

Гниение – это процесс глубокого разложения белковых веществ микроорганизмами. Одним из конечных продуктов разложения белков является аммиак (NH_3), поэтому процесс гниения называют также *аммонификацией* белковых веществ, а бактерии – *гнилостными*, или *аммонификаторами*.

Схематично процесс расщепления белков представлен на рис.4.4.

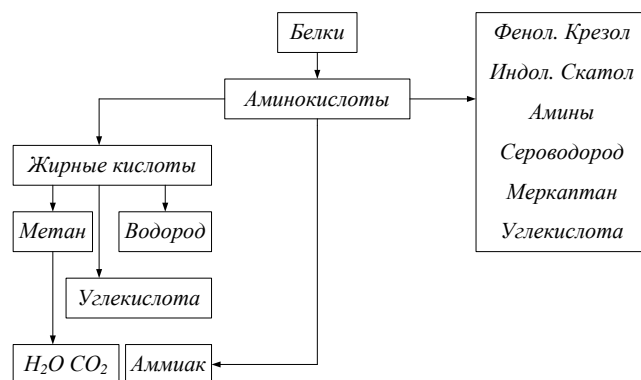


Рисунок 4.4. – Схема расщепления белков

Рисунок 3.17 – Иммобилизация ферментов путем включения в гель, полученный путем полимеризации низкомолекулярного мономера (а) и готового полимера (б)

Метод перспективен, особенно в применении к целым клеткам. Клетки сохраняют жизнеспособность и высокую каталитическую активность, способны реализовать многостадийные, полиферментные реакции. Применяют как природные, так и синтетические полимерные материалы: альгинат, каррагинан, коллаген, желатину, целлюлозу, полиакриламид.

Способ включения биологического материала в полимерную структуру определяется спецификой полимера. Полимеризация альгината и каррагинана, добываемых из морских водорослей, зависит от Ca^{2+} (для альгината) и Al^{3+} , Mo^{2+} , K^{+} (для каррагинана). Биокатализатор вносят в раствор мономеров (альгината или каррагинана), и полученную смесь по каплям добавляют в водный раствор соответствующих катионов. Образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованный биокатализатор.

Важным технологическим параметром является однородность полученных гранул. Однородные гранулы образуются при пропускании раствора «будущего полимера» с биокатализатором через специальные иглы, формирующие капли стандартных размеров. Новая перспективная технология, основана на образовании однородных капель при разрыве струи жидкости с применением приспособления типа пульверизатора, дающего мелкие (менее 1 мм) однородные капли. Эта технология успешно применена при получении гранул альгината кальция со включенными клетками пекарских дрожжей.

Преимущества метода иммобилизации путем включения в гель: простота применяемых методик, возможность создания иммобилизованных препаратов любой геометрической конфигурации (гранулы, пленки т.п.). Многие полимерные гели обладают высокой химической и тепловой стойкостью, что дает возможность многократно использовать иммобилизованные катализаторы на их основе. Иммобилизация в геле приводит к значительной стабилизации ферментов и к их защите от

инактивации вследствие бактериального заражения, поскольку клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу.

Основным недостатком метода является то, что полимерная матрица создает значительное препятствие для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность метода. Если в роли субстрата выступает высокомолекулярное соединение, то этот способ иммобилизации вообще неприменим.

Иммобилизация с использованием полупроницаемых мембран

Общий принцип, лежащий в основе этого способа иммобилизации, состоит в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но представляет собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента (рис. 3.18).

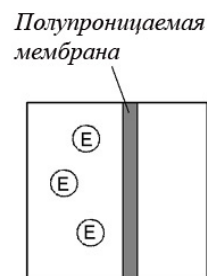


Рисунок 3.18 – Иммобилизация с использованием полупроницаемых мембран

Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Наиболее распространен метод инкапсулирования. Суть его состоит в том, что биокатализаторы покрывают специальными полупроницаемыми оболочками, изготовленными из различных материалов – целлюлозы, полиакрилата, полистирола, полиуретана, липидов (рис. 3.19).

Технология инкапсулирования заключается в том, что клетки или

При увеличении содержания уксусной кислоты в культуре свыше 8 % рост бактерий замедляется, при 12–14 % – прекращается. Поэтому процесс проводят в батарее последовательно соединенных аппаратов (рис. 4.3). Первый выполняет роль инокулятора, поэтому в него непрерывно подают свежую среду, засевают уксуснокислыми бактериями и поддерживают условия, оптимальные для быстрого образования биомассы бактерий.

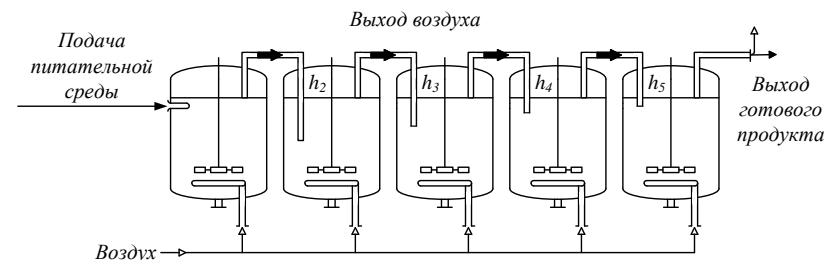


Рисунок 4.3 – Схема установки для получения уксуса непрерывным способом

Содержимое ферментатора перемешивается мешалкой, а через барботер непрерывно подается воздух. Культура из первого аппарата поступает во второй аппарат и далее – в последующие; при этом транспортировка культуральной жидкости осуществляется воздухом. В каждом аппарате условия ферментации стабилизируются в соответствии с требованиями течения хода ферментации, при постепенном понижении температуры среды от 28 °С в первом аппарате до 25 °С – в последнем. Режим аэрации также изменяется от 0,4 м³/м³мин до 0,15 м³/м³мин. Концентрация спирта со второго по четвертый аппарат стабилизируется на требуемом уровне подачей в них среды с 40 % этанолом. Из последнего аппарата выводится культуральная жидкость с содержанием ацетата не ниже 9,0 % и не выше 9,3 %. Выход кислоты составляет до 90 кг из 100 л безводного спирта. На постферментационной стадии после отделения бактериальной биомассы раствор уксуса фильтруют, освобождая от окрашенных и взвешенных частиц, и далее подвергают пастеризации.

оптимальные значения pH 5,4–6,3. Уксуснокислые бактерии широко распространены в природе, обитают на цветах, на зрелых фруктах, ягодах, овощах, обнаруживаются в садовой почве, в прокисших фруктовых соках, пиве, вине, квашеных овощах.

Уксуснокислые бактерии используются для промышленного получения спиртового натурального уксуса. Исходным сырьем является раствор спирта, содержащий небольшое количество сахарозы, минеральные соли в качестве источников азота, фосфора, серы, калия и магния, а также уксусную кислоту. Подкисление необходимо для предотвращения развития посторонних микроорганизмов. Производственной культурой является *Acetobacter aceti*.

В настоящее время процесс реализуют как периодическим (поверхностным), так и непрерывным (глубинным) способом. Принцип методов заключается в создании возможно большей поверхности для окисления спирта. Поверхностный режим протекает в струйных генераторах объемом до 60 м³, наполненных скрученной буковой стружкой, на поверхности которых закрепляются уксуснокислые бактерии. В стенках окислителя имеются отверстия для засасывания воздуха. Исходный питательный раствор распыляют по поверхности стружек, а уксуснокислые бактерии, густо заселяющие стружку, окисляют спирт в уксусную кислоту. Раствор стекает, собираясь в нижней части аппарата. После этого жидкость собирают и вновь закачивают в верхнюю часть аппарата. Процедуру повторяют 3–4 раза, в результате в течение 3-х дней до 90 % спирта трансформируется в ацетат и накапливается уксусная кислота в количестве 9–10 %. Готовый уксус сливают, и цикл повторяется сначала.

В настоящее время разработан и реализован эффективный непрерывный способ получения уксусной кислоты глубинным методом в батареях ферментаторов (обычно 5 аппаратов). Температура культивирования составляет 28 °С. Наилучшим сырьем для процесса является этиловый спирт, полученный из зерно-картофельного сырья, при его концентрации около 10 %. Оптимум pH для развития бактерий – около 3.

ферменты вначале включают в полимерную структуру, а затем образовавшиеся гранулы «одевают» полупроницаемой мембраной; при этом образуются замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной пленкой – микрокапсулы.



Рисунок 3.19 – Инкапсулирование ферментов

В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрон, а толщина мембраны составляет сотые – десятые доли микрон при диаметре пор порядка нескольких нанометров.

Для образования микрокапсул гранулы полимера, содержащего биокатализатор, помещают в эмульсию вода/масло, а затем при энергичном перемешивании добавляют эфирный раствор полимера, обычно нитрата целлюлозы. При соприкосновении с поверхностью эмульсионных капель этот полимер, будучи нерастворимым в воде, образует тонкую оболочку – микрокапсулу. Готовые микрокапсулы отделяют центрифугированием или фильтрованием и промывают. Затем внутрь капсул вводят вещество, разрушающее полимер, вследствие чего он распадается на мономеры, диффундирующие через мембрану во внешний раствор. Клетки, подобно малькам в оболочке икринки, приобретают свободу движения в пределах капсулы, что способствует их росту и доступу к ним питательных веществ. Размеры пор в мембранах устанавливают с таким расчетом, чтобы в капсулах задерживался целевой продукт, а более низкомолекулярные примеси легко из них вымывались. По окончании процесса биосинтеза с участием биокатализатора капсулы тщательно отмывают, разрушают и отделяют центрифугированием от

раствора, содержащего целевой продукт.

Метод перспективен для синтеза препаратов пищевого и медицинского назначения.

К числу основных достоинств этого метода иммобилизации можно отнести его простоту и универсальность (возможность включения не только индивидуальных ферментов, но и полиферментных систем, клеток, ферментов, предварительно иммобилизованных каким-либо иным способом, и т.п.). Иммобилизованные в мембранных системах ферменты в значительной степени сохраняют свою каталитическую активность, а их стабильность часто существенно возрастает. Эффект стабилизации обеспечивается, в частности, за счет исключения деградации ферментов под действием микроорганизмов, которые не могут проникнуть сквозь мембрану.

Основным недостатком мембранных систем, как и систем на основе полимерных гелей, является невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов, для которых мембрана создает непреодолимый диффузионный барьер.

Как видно, каждый из методов иммобилизации имеет свои достоинства и недостатки. Для каждого типа биокатализаторов есть свои предпочтительные методы. Клетки чаще всего иммобилизуют включением в полимерные структуры, в то время как ферменты предпочитают иммобилизовать на поверхности носителей. Применяют также комбинации различных методов. Например, раствор фермента смешивают с золем кремниевой кислоты, и смесь наносят на пористый носитель – оксид алюминия. В этих условиях золь за 1–2 минуты переходит в гель, так что фермент оказывается одновременно включенным в гелевую структуру и адсорбированным на носителе.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. Дайте характеристику основных стадий типового биотехнологического производства.
2. Назовите основные компоненты производственных питательных

го кислорода но, в отличие от аэробного дыхания (полного окисления), являются процессами неполного окисления. Эти процессы лежат в основе производства пищевого уксуса, органических кислот (лимонной, щавелевой и др.).

Получение уксусной кислоты из спиртосодержащих жидкостей было известно более 10 тыс. лет назад. В те времена древние греки и римляне использовали уксус в качестве освежающего напитка и получали его, главным образом, оставляя вино открытым.

Уксуснокислое брожение основано на способности уксуснокислых бактерий окислять спирт кислородом воздуха в уксусную кислоту:



В промышленных технологиях для получения уксуса используют уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*.

Уксуснокислые бактерии – строгие аэробы. Некоторые из них могут вызывать процесс так называемого переокисления, т.е. дальнейшего полного окисления образовавшейся из спирта уксусной кислоты до CO_2 и H_2O :

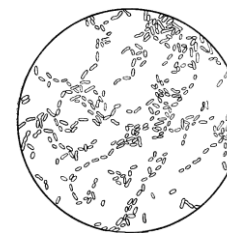
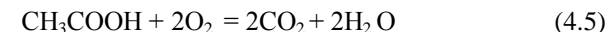
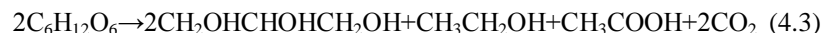


Рисунок 4.2–Уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*

Этот процесс представляет большую опасность в производстве уксуса. Уксуснокислые бактерии различаются по своей устойчивости к спирту, способности накапливать различное количество уксусной кислоты (от 4,5 % до 9–11 %). Оптимальная температура для их развития – около 30 °С. Они кислотоустойчивы, могут развиваться при pH около 3,

сосуда, образуя плотный осадок.

Кислотность среды. Спиртовое брожение протекает при кислых значениях $pH = 4-5$. При подщелачивании среды до $pH 8$ дрожжи в качестве основного продукта брожения накапливают не спирт, а глицерин (до 40 % по отношению к сброженному сахару). Это так называемая *глицериновая форма* спиртового брожения:



Практическое использование спиртового брожения. Ряд пищевых производств основан на жизнедеятельности сахаромикетов, вызывающих спиртовое брожение. Оно лежит в основе производства этилового спирта, пива, вина, а также хлебопечения. Совместно с молочнокислым брожением оно используется для производства кваса, кефира, кумыса. Дрожжи, используемые на том или ином производстве, обладают специфическими качествами. Более того, в одном и том же производстве могут применяться разновидности одного и того же вида, отличающиеся между собой одной или несколькими особенностями. Такие культуры обычно называют *расами* (штаммами). Их получают, как правило, из одной клетки. Каждое производство располагает несколькими расами, удовлетворяющими определенным требованиям.

Этиловый спирт – основной продукт брожения – находит широкое применение во многих отраслях народного хозяйства. Основными потребителями спирта являются пищевая, медицинская и химическая промышленность; он может быть использован как источник углерода для производства биомассы микроорганизмов, а также в качестве транспортного топлива.

Продуктом спиртового брожения является вино. Сырьем в производстве вин служит виноградный сок, который сульфитируют (обрабатывают SO_2) с целью подавления развития посторонних микроорганизмов, а затем сбраживают.

Аэробные процессы превращения органических безазотистых веществ осуществляются микроорганизмами в присутствии молекулярно-

сред и источники этих компонентов, используемые для приготовления питательных сред.

3. Что такое критерий стерилизации объекта? Изложите методику расчета суммарного критерия стерилизации в условиях нестационарного температурного режима.

4. Каковы особенности процессов массо- и теплопередачи в биотехнологии?

5. Обоснуйте выбор систем перемешивания, аэрации и теплообмена для биореакторов.

6. Чем определяется выбор метода выделения целевого продукта биосинтеза из культуральной среды?

7. Каковы преимущества иммобилизованных биокатализаторов перед свободными?

8. Назовите основные методы иммобилизации ферментов и клеток, их преимущества и недостатки.

ГЛАВА 4. СПЕЦИАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

4.1. Основные типы биохимических процессов, используемых в пищевых и бродильных производствах

В процессе производства пищевых продуктов происходят биохимические превращения исходных субстратов в целевые продукты. Важнейшие биохимические процессы, лежащие в основе пищевых производств, делятся в зависимости от состава используемого субстрата на две основные группы:

- превращения органических веществ, не содержащих азот (безазотистых органических веществ) – это различные виды брожения и окисления;
- превращения органических веществ, содержащих азот (гниение).

4.1.1. Биохимическое превращение органических веществ,

не содержащих азот (безазотистых веществ)

Процессы превращения безазотистых веществ могут происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

К анаэробным процессам относятся различные виды брожений: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и др.

Спиртовое брожение вызывается дрожжами рода *Saccharomyces* (сахаромицеты), некоторыми бактериями и отдельными видами грибов. Основные возбудители этого брожения – сахаромицеты (рис. 4.1).

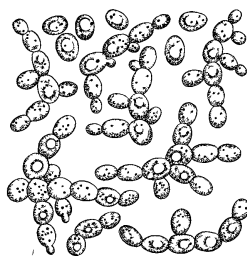
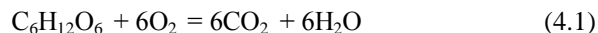


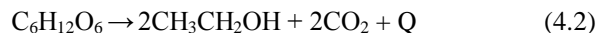
Рисунок 4.1 – Дрожжи рода *Saccharomyces*

Сахаромицеты являются факультативными анаэробами. В аэробных условиях дрожжи получают энергию путем полного окисления моно- и дисахаридов до CO_2 и H_2O , т. е. путем аэробного дыхания:



Этот процесс лежит в основе производства хлебопекарных (пресованных) и кормовых дрожжей, где необходимо, чтобы сахар потреблялся, главным образом, на размножение дрожжей, в результате чего накапливалась бы значительная биомасса.

В анаэробных условиях необходимую для жизнедеятельности энергию дрожжи получают путем сбраживания моно- и дисахаридов по суммарному уравнению:



Как и любое брожение, это сложный многостадийный процесс, протекающий при участии комплекса разнообразных ферментов, имеющих у дрожжей. Каждая стадия катализируется соответствующим фермен-

том.

Наряду с основными продуктами брожения, в незначительных количествах образуются побочные продукты: глицерин, уксусный альдегид, уксусная и янтарная кислоты, сивушные масла (смесь высших спиртов).

Общие условия спиртового брожения. На развитие дрожжей и ход брожения оказывают влияние многие факторы: состав сбраживаемой среды, содержание спирта, температура, pH, раса дрожжей.

Состав сбраживаемой среды. Большинство дрожжей способно сбраживать моносахариды (глюкозу, фруктозу) и дисахариды (сахарозу, мальтозу), некоторые дрожжи могут сбраживать пентозы (ксилозу, арабинозу). Крахмал дрожжи не сбраживают, так как амилалитические ферменты у них отсутствуют. Поэтому крахмалсодержащее сырье для бродильных производств предварительно подвергают *осахариванию* (частичному гидролизу) при участии амилаз различного происхождения. Концентрация сахара 10–15 % наиболее благоприятна для большинства дрожжей.

Содержание спирта. На дрожжи оказывает неблагоприятное действие этиловый спирт, накапливающийся в среде. Отношение различных дрожжей к спирту неодинаково. Угнетающее действие проявляется уже при концентрации 2–5 %, брожение прекращается в большинстве случаев при 12–14 %. Имеются и спиртоустойчивые дрожжи, которые выносят содержание спирта до 18 %.

Температура. По отношению к температуре сахаромицеты подразделяются на верховые и низовые. *Верховые*, или *дрожжи верхового брожения*, вызывают бурное и быстрое брожение при температуре 20–28 °С. При этом они всплывают на поверхность под действием выделяющегося диоксида углерода. По окончании брожения дрожжи оседают на дно бродильных сосудов рыхлым слоем.

Низовые, или *дрожжи низового брожения*, осуществляют более спокойное или медленное брожение при температуре 5–10 °С. Газ выделяется постепенно, пены образуется меньше, дрожжи оседают на дно

пользуются, как правило, для обработки рабочих поверхностей аппаратов и другого технологического оборудования, инвентаря, тары, посуды и помещений. В пищевой промышленности можно применять лишь такие препараты, которые не оказывают токсического действия на организм человека, не имеют запаха и вкуса. Кроме того, они должны обладать антимикробным действием при минимальной концентрации, растворяться в воде и быть эффективными при небольших сроках действия. Большое значение имеет также их стойкость при хранении. Препараты не должны оказывать разрушающего действия на материал оборудования, должны быть дешевы и удобны для транспортирования.

Для обработки оборудования на предприятиях пищевой промышленности в основном применяются хлорсодержащие вещества, дезинфицирующее действие которых обусловлено выделением активного хлора. Обычно для дезинфекции применяют растворы, содержащие 150–200 мг активного хлора в 1 л. Продолжительность обработки оборудования должна быть не менее 15 мин. К *неорганическим* хлорсодержащим дезинфицирующим веществам относятся: хлорная известь, антиформин (смесь хлорной извести, кальцинированной и каустической соды), гипохлорит натрия; к *органическим* – хлорамин Б, синтетические препараты (дихлордиметилгидантоин) и сложные комбинации хлорактивных соединений с поверхностно-активными веществами (например, сульфохлорантин, обладающий одновременно смачивающим, моющим и высоким антимикробным эффектом). В качестве дезинфектантов применяют также формалин (водный раствор формальдегида), известковое молоко, кальцинированную и каустическую соду.

Высокой антимикробной активностью в малых дозах обладают органические синтетические дезинфектанты – так называемые четвертичные аммониевые соединения. Их преимущество перед существующими антимикробными средствами заключается в том, что они хорошо растворимы в воде, не имеют запаха, вкуса, не вызывают коррозии металлов, не раздражают кожи рук персонала. К ним относятся, в частности, катамин-АБ, катапин-П. Эти соединения не токсичны для организ-

мителями многих пищевых продуктов, обладающих высокой пищевой ценностью (мяса и мясопродуктов, рыбы и рыбопродуктов, молока и молочных продуктов, яиц и др.).

В природе (в воде, почве) гнилостные бактерии активно разлагают отмершие животные и растения, минерализуют белковые вещества и тем самым играют важную роль в круговороте углерода и азота.

4.2. Основы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности

Микроорганизмы в пищевой промышленности играют двоякую роль. С одной стороны, многие пищевые производства основаны на их жизнедеятельности: хлебопечение, производство хлебопекарных дрожжей, сыроделие, производство спирта, пива, кваса, производство кисломолочных продуктов (творог, сметана, простокваша и др.), органических кислот (уксусная, лимонная, молочная) и др. Для получения этих продуктов используют чистые культуры микроорганизмов.

С другой стороны, в пищевые производства попадает инфекция, т. е. посторонние микроорганизмы. Это либо неопасные для здоровья человека сапрофиты, которые являются вредителями производства, и в результате их жизнедеятельности нарушается технологический процесс, возрастают потери сырья, снижается выход и качество готовой продукции; либо патогенные микроорганизмы, которые могут нанести вред здоровью человека, явиться причиной тяжелых инфекционных заболеваний и пищевых отравлений. На всех пищевых предприятиях необходимо осуществлять строгий микробиологический контроль с целью выявления посторонних микроорганизмов, и в случае их обнаружения проводить дезинфекцию.

4.2.1. Источники посторонних микроорганизмов в пищевых производствах

На пищевых предприятиях могут быть внешние (внезаводские) и внутренние (внутризаводские) источники инфекции. К внезаводским

относятся сырье, вода и воздух, к внутризаводским – воздух производственных помещений, производственная культура микроорганизма, технологическое оборудование, тара, руки, одежда, обувь персонала.

4.2.1.1. Внезаводские источники инфекции. *Сырье.* Одним из условий получения продукции высокого качества является доброкачественность сырья, что зависит от условий и сроков его хранения.

На поверхности плодов, ягод, овощей постоянно находится большое количество различных микроорганизмов, способных размножаться при небольшой концентрации питательных веществ. Они составляют так называемую эпифитную микрофлору, численность и видовой состав которой изменяются от вида растения, климатических и других условий. Характерными представителями эпифитной микрофлоры плодов и ягод являются различные дрожжи, молочные и уксуснокислые бактерии, споры плесневых грибов. Зерно и солод обильно инфицированы эпифитной микрофлорой, среди которой обнаружены споры грибов, молочнокислые бактерии и различные кокки.

Подробно микрофлора отдельных видов сырья, полуфабрикатов, а также вспомогательных материалов (сахар, соль, специи, ароматические травы и др.), ее происхождение и вред, наносимый ею, рассматриваются в специальных разделах микробиологии конкретно для каждого производства.

Вода. Пищевая промышленность Украины насчитывает более 20 отраслей, из которых наиболее водоемкими являются сахарное, масло-жировое, спиртовое, крахмало-паточное, дрожжевое, пивобезалкогольное и консервное производства. Вода является составной частью промышленной продукции, растворителем, средством транспортирования и мойки сырья, оборудования, охладителем, теплоносителем, используется для поддержания необходимых санитарно-гигиенических условий в производственных помещениях и на территории предприятия, для получения пара и т. д.

Требования к качеству воды для производственных нужд зависят

обладают соли тяжелых металлов (ртути, меди, серебра), окислители (хлор, озон, иод, пероксид водорода, хлорная известь, перманганат калия), щелочи и кислоты (едкий натр, сернистая, фтористоводородная, борная кислоты), некоторые газы (сероводород, оксид углерода, сернистый, углекислый газ).

Вещества органической природы (спирты, фенолы, альдегиды, особенно формальдегид) оказывают губительное действие на микроорганизмы. Механизм губительного действия антимикробных веществ различен и зависит от их химической природы. Например, спирты, эфиры растворяют липиды ЦПМ, вследствие чего они легко проникают в клетку и нарушают ее нормальную жизнедеятельность. Соли тяжелых металлов, формалин вызывают быструю коагуляцию белков цитоплазмы, фенолы, хлор, озон – инактивацию ферментов, кислоты и щелочи – гидролиз белков.

Антимикробные химические вещества используются в качестве дезинфицирующих средств и антисептиков.

Дезинфицирующие вещества вызывают быструю (в течение нескольких минут) гибель бактерий, они активны в средах, бедных органическими веществами, уничтожают не только вегетативные клетки, но и споры. Они не вызывают появления устойчивых форм микроорганизмов.

Антисептики, в отличие от дезинфектантов, проявляют микробоцидное действие через 3 ч и более. Наибольшая активность проявляется в средах, содержащих органические вещества. Антисептики уничтожают только вегетативные клетки и вызывают образование устойчивых форм микроорганизмов.

Такие антимикробные вещества, как фенолы, хлорамин, формалин, в больших концентрациях 2–5 % являются дезинфектантами, но их же растворы, разбавленные в 100–1000 раз, могут быть использованы как антисептики. Многие антисептики используют в качестве консервантов пищевых продуктов (сернистая, бензойная и другие кислоты)

Дезинфицирующие вещества в пищевой промышленности ис-

ных заболеваний среди персонала, при поступлении инфицированного сырья, полуфабрикатов, тары и т. п.

По виду действующего агента методы дезинфекции бывают физические и химические.

К *физическим* средствам дезинфекции относятся: кварцевое и ультрафиолетовое облучение, ультразвук, действие высоких температур (обжигание, прокаливание, кипячение, ошпаривание посуды, тары и оборудования, обработка острым паром).

К *химическим* средствам дезинфекции относится большое количество химических веществ, обладающих антимикробным действием.

Влияние антимикробных химических веществ на микроорганизмы. Химические вещества по характеру действия бывают *микрообцидными* (вызывают гибель микроорганизмов) и *микростатическими* (приостанавливают рост микроорганизмов, но после удаления этого вещества их рост опять возобновляется). Характер действия зависит от дозы вещества, времени его воздействия, температуры и pH. Малые дозы антимикробных веществ часто стимулируют развитие микроорганизмов. С повышением температуры токсичность многих антимикробных веществ, как правило, возрастает. Температура влияет не только на активность самого химического вещества, но и на микроорганизмы. При температурах, превышающих максимальную для данного микроорганизма, даже небольшие дозы антимикробных веществ вызывают их гибель. Аналогичное действие оказывает и pH среды.

К различным антимикробным веществам один и тот же микроорганизм проявляет разную степень устойчивости. В то же время одно и то же вещество может оказывать неодинаковое действие на различные виды микроорганизмов: одни микробы могут сразу погибнуть, другие приостанавливают развитие, а на некоторые вообще не оказывает никакого действия. Это зависит от наличия спор и капсул, устойчивых к химическим веществам. Антимикробные вещества значительно сильнее действуют на вегетативные клетки, чем на споры.

Из неорганических веществ сильным антимикробным действием

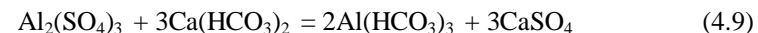
от ее назначения. Если вода входит в состав готовой продукции (безалкогольные напитки, пиво, компоты, маринады, рассолы и т. п.), то она должна быть прозрачной, по возможности бесцветной, без постороннего запаха и вкуса; не должна содержать посторонних примесей, влияющих на здоровье человека, а также патогенных микроорганизмов. Вода должна отвечать требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством».

При использовании микробиологически загрязненной воды в производство могут попасть возбудители инфекционных заболеваний, пищевых отравлений, а также различные сапрофиты – гнилостные, кислотообразующие бактерии, которые могут оказывать неблагоприятное воздействие не только на ход технологического процесса, но и на качество и стойкость готовой продукции при хранении.

Наиболее полно удовлетворяют требованиям стандартов артезианские и родниковые воды. Ими можно пользоваться без предварительной очистки.

Воду из открытых водоемов подвергают специальной обработке на водоочистных станциях.

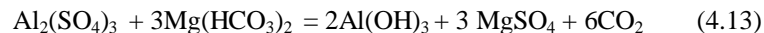
Первым этапом является отстаивание воды в специальных бассейнах (отстойниках) для удаления взвесей, осветления, обесцвечивания воды, удаления нежелательных привкусов и запахов, обессоливания и опреснения воды и т. д. Для ускорения отстаивания и более эффективного осветления и обесцвечивания воды применяют *коагулянты* – вещества, вызывающие укрупнение коллоидных частиц и последующее выпадение их в осадок. В качестве коагулянтов применяют соли алюминия и железа. При использовании, к примеру, сульфата алюминия происходит его взаимодействие с растворенными в воде гидрокарбонатами кальция и магния по уравнениям:



Образующийся гидрокарбонат алюминия неустойчив и распадается на гидроксид алюминия и диоксид углерода:



Суммарно:



Гидроксиды алюминия выпадают в виде хлопьев. Оседая, хлопья увлекают за собой взвеси и клетки микроорганизмов.

Вторым этапом является фильтрование воды через слой речного песка. В верхних слоях фильтра формируется биологическая пленка, состоящая из содержащихся в воде примесей и хлопьев коагулянтов и содержащая большое количество микроорганизмов.

Третий этап – обеззараживание профильтрованной воды, т. е. уничтожение оставшихся в воде микроорганизмов, среди которых могут быть и патогенные, с помощью различных дезинфицирующих средств.

В ряде процессов с успехом может использоваться вода непитьевого назначения (для охлаждения оборудования, транспортирования некоторых видов сырья, отходов и др.). Например, в сахарной промышленности удельный вес технической воды может достигать 90–95 % от общего количества потребляемой предприятием воды (включая оборотную воду). Для мойки некоторых видов сырья (картофеля, сахарной свеклы, зерна и др.) и тары с целью экономии чистой воды, сокращения количества сточных вод и моющих препаратов применяется оборотная вода. Оборотная вода перед повторным использованием обязательно подвергается очистке с целью удаления грубых примесей и дезинфекции, а затем используется на тех же операциях или в других аппаратах и процессах. Например, теплая вода после охлаждения оборудования, конденсации паров идет на мойку оборудования, полов.

Воздух. В пищевой промышленности микрофлора атмосферного воздуха имеет значение лишь на тех участках технологического процесса, где сырье, полуфабрикаты или готовый продукт соприкасается с ним. Здесь имеет значение также температура и относительная влажность воздуха.

4.2.1.2. Внутризаводские источники инфекции. Воздух произ-

Общее количество микроорганизмов в 1 мл и коли-индекс не должны значительно отличаться от обсемененности воды, применяемой в производстве.

Контроль чистоты рук и одежды персонала. При несоблюдении личной гигиены (чистоты рук, одежды), особенно во время ручных операций, на пищевые продукты могут попадать микроорганизмы, в том числе и патогенные.

Бактериальную загрязненность рук и одежды определяют путем исследования микрофлоры смывов. В смывах, которые берут перед началом работы, обычно определяют общую бактериальную обсемененность и наличие кишечной палочки. Чистоту рук оценивают по количеству микроорганизмов в 1 мл смыва:

отлично	1000;
хорошо	1000 – 5000;
удовлетворительно	5000 – 10000;
плохо	свыше 10000.

Наличие бактерий группы кишечной палочки в смывах с рук и одежды не допускается.

4.3. Дезинфекция в пищевой промышленности

Дезинфекцией (обеззараживанием) называется уничтожение в объектах внешней среды сапрофитных микроорганизмов – вредителей данного производства, которые вызывают порчу сырья, полуфабрикатов и готовой продукции, а также патогенных микроорганизмов – возбудителей пищевых инфекций и пищевых отравлений. Различают текущую и экстренную дезинфекцию.

Текущая, или профилактическая дезинфекция проводится систематически в соответствии с установленными санитарными требованиями для каждой отрасли промышленности с целью предупреждения загрязнения продуктов микроорганизмами.

Экстренная дезинфекция проводится по эпидемиологическим показаниям: при подозрении на пищевое отравление, в случае инфекцион-

После санитарной обработки проводят санитарно-гигиенический контроль качества мойки и дезинфекции оборудования, инвентаря, тары, который включает определение коли-индекса и общей бактериальной обсемененности смывов с технологического оборудования. Смывы берут с помощью стерильных нержавеющих металлических трафаретов с вырезанной серединой (площадь выреза 10, 25 или 100 см²). Эту площадь протирают стерильным ватным тампоном, смоченным в пробирке на 10 мл со стерильной водой, после чего тампон погружают в эту же пробирку, тщательно перемешивают содержимое и высевают 1 мл смыва на мясо-пептонный агар. После термостатирования посевов при 30 °С в течение 24–28 ч определяют общую бактериальную обсемененность в пересчете на 1 см² исследуемой поверхности.

В смывах с хорошо вымытого оборудования общее количество микроорганизмов и коли-индекс не должны превышать их содержания в чистой воде, поступающей на мойку.

Контроль качества мойки и дезинфекции *трубопроводов, рукавов, шлангов* подобным образом осуществить нельзя, так как с их внутренней поверхности трудно сделать смывы с помощью трафарета. В этом случае общее количество микроорганизмов и коли-индекс определяют в последней промывной воде путем ее микроскопирования и посева. Общая бактериальная обсемененность и коли-индекс промывной воды не должны отличаться от показателей воды, применяемой в производстве.

Для контроля качества мойки и дезинфекции *инвентаря* пробы отбирают в тот момент, когда инвентарь подготовлен к работе. С мелкого инвентаря (мешалки, пробники, термометры, ножи, шприцы и т. п.) мазки берут стерильным тампоном со всей поверхности предмета и исследуют на общее количество микроорганизмов и на наличие кишечной палочки. Со столов, стеллажей, лотков, ведер, лопат и т. д. мазки берут стерильным тампоном при помощи обожженного трафарета и производят аналогичные анализы.

Для контроля качества мойки и дезинфекции *тары* (бочки, бидоны, цистерны) пробы последней промывной воды микроскопируют.

водственных помещений представляет значительную опасность в пищевых производствах. Он является внутризаводским источником загрязнения

сырья, оборудования, производственных культур микроорганизмов и готовой продукции. Поэтому чистота воздуха является важным условием для получения высококачественного готового продукта.

Для снижения бактериальной обсеменности воздуха производственных помещений применяют физические способы его очистки. С помощью вентиляции загрязненный воздух удаляется из помещений, а на его место поступает более чистый атмосферный воздух. Фильтрация поступающего воздуха через специальные фильтры значительно повышает эффективность очистки. Фильтры заполняют гранулированным зернистым и волокнистым фильтровальным материалом, используя гранулированный уголь и специальные бактерицидные волокна. Это обеспечивает практически 100 %-ную очистку и стерилизацию воздуха.

Производственная культура. В тех отраслях пищевой промышленности, где производство основано на жизнедеятельности микроорганизмов, производственная культура (дрожжи, молочнокислые бактерии, мицелиальные грибы и др.) часто служит источником внутризаводской инфекции. Причиной ее загрязнения являются неудовлетворительное санитарное состояние аппаратуры, воды, воздуха, негерметичность производственного оборудования.

Даже чистая культура, полученная из аппарата для ее разведения, после соприкосновения с производственной питательной средой и коммуникациями перестает быть чистой, поскольку технологический процесс ведется в нестерильных условиях. Такая культура переносит инфекцию с одного участка технологического процесса на другой, в результате чего загрязняется все оборудование.

Технологическое оборудование и тары. Чистота оборудования, аппаратуры, коммуникаций и тары имеет исключительно большое значение для качества готовой продукции. Некачественная мойка, нерегулярная дезинфекция приводят к большой обсемененности продукта и явля-

ются причиной выпуска недоброкачественной продукции и низкой стойкости ее при хранении. Эффективность мойки и дезинфекции зависит от степени загрязнения материала и состояния обрабатываемых поверхностей оборудования.

Остатки полупродуктов и отходов представляют для микроорганизмов хорошую питательную среду, где они начинают быстро размножаться и загрязняют все производство. Скорость размножения зависит от состояния поверхности и материала аппарата. Так, у алюминия и нержавеющей стали поверхность матовая или полированная, у стали с эмалированным покрытием и стекла совершенно гладкая, без пор, у резины – пористая, а у древесины – шероховатая. Лучше всего смываются остатки полупродукта и микроорганизмы с оборудования из нержавеющей стали, стекла, органического стекла, стеклопластика, полиэтилена, алюминия, хуже – с поверхности деревянных емкостей. В то же время в алюминиевых емкостях при плохом уходе или при применении несоответствующих моющих и дезинфицирующих средств вследствие коррозии появляются трещины и микропоры, которые являются очагами инфекции.

Коммуникации, рукава, шланги из резины на внутренней поверхности также становятся пористыми, образуют трещины за счет постепенного наложения там загрязняющих осадков и их подсыхания, куда проникают и начинают размножаться микроорганизмы. Очагами инфекции являются углы, закругления в оборудовании, тройники, фланцевые соединения, низко расположенные штуцеры и т. п., которые невозможно хорошо продезинфицировать.

Обслуживающий персонал. При несоблюдении личной гигиены персонал может явиться разносчиком инфекции на пищевом предприятии. Особую опасность представляют больные желудочно-кишечными и гнойничковыми заболеваниями, а также носители патогенных микроорганизмов. Персонал пищевых производств должен следить за состоянием своего здоровья, соблюдать правила личной гигиены – следить за чистотой своего тела, рук, особенно ногтей, работать в чистой санитар-

фитных микроорганизмов в 1 м³. *Вторым* показателем является количество в том же объеме воздуха санитарно-показательных микроорганизмов – гемолитических стрептококков и стафилококков. Нормативов по этому показателю в настоящее время нет. Обнаружение их в воздухе производственных помещений указывает на санитарное неблагополучие данного объекта и возможность возникновения у персонала инфекционных заболеваний (ангины, гриппа, коклюша, дифтерии, туберкулеза и др.), вызываемых микрофлорой дыхательных путей, которая передается через воздух. Такой воздух может стать источником обсеменения пищевых продуктов, а следовательно, представлять потенциальную опасность для здоровья людей.

Контроль оборудования, инвентаря, тары. Для предотвращения загрязнения посторонними микроорганизмами сырья и полуфабрикатов в процессе их переработки, а также готовой продукции при ее хранении необходимо поддержание чистоты на рабочем месте, в производственных помещениях, проведение регулярной санитарной обработки оборудования, инвентаря, тары.

Санитарная обработка включает:

- механическую очистку рабочих поверхностей от остатков пищевых продуктов;
- тщательное промывание рабочих поверхностей горячей водой с применением моющих средств;
- дезинфекцию и последующее тщательное промывание рабочих поверхностей горячей водой до полного удаления дезинфицирующего средства (дезинфектанта).

Дезинфекция оборудования может осуществляться путем пропаривания его насыщенным паром, при котором гибнут как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Можно проводить дезинфекцию и химическими дезинфицирующими средствами. Заключительная обработка горячей водой играет двоякую роль: с одной стороны, удаляются остатки дезинфектанта, с другой, – происходит нагревание поверхностей, что способствует их быстрому высыханию.

состояния обслуживающего персонала (чистоты рук, одежды, обуви и т. п.). Он осуществляется микробиологической лабораторией предприятия и санитарно-эпидемиологическими станциями.

Контроль пищевых продуктов. Для оценки качества сырья, полуфабрикатов, вспомогательных материалов, готовой продукции используются два показателя – общая бактериальная обсемененность (ОБО) и количество бактерий кишечной группы (преимущественно кишечной палочки). Существуют нормы допустимой общей бактериальной обсемененности и содержания кишечной палочки для конкретных объектов контроля.

Контроль воды. Для санитарно-гигиенической оценки воды используются два микробиологических показателя: общее количество бактерий в воде и коли-индекс.

Общее количество бактерий – это количество колоний аэробных и факультативно-анаэробных мезофильных сапрофитных бактерий, вырастающих при посеве 1 мл неразбавленной воды на мясо-пептонной среде за 24 ч при 37 °С.

Для оценки качества воды наиболее важным микробиологическим показателем является величина коли-индекса, характеризующая загрязненность воды патогенными бактериями кишечной группы. В соответствии с ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством» общее количество клеток бактерий в 1 мл воды должно быть не более 100, а коли-индекс – не более 3 в 1 л.

Анализ воды проводится при пользовании городским водопроводом 1 раз в квартал, а при наличии собственных источников водоснабжения – 1 раз в месяц.

Контроль воздуха производственных помещений. Для санитарно-гигиенической оценки воздуха закрытых помещений определяют два показателя.

Первым является общее количество сапрофитных микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Воздух производственных цехов пищевых производств считается чистым, если в нем содержится не более 500 сапро-

ной одежде.

4.2.2. Патогенная микрофлора. Санитарно-показательные микроорганизмы

Патогенность – это потенциальная способность определенного вида микробов приживаться в макроорганизме, размножаться и вызывать определенное заболевание. Патогенные микроорганизмы являются паразитами. В процессе приспособления к паразитическому образу жизни они утратили способность к образованию целого ряда ферментов и стали использовать необходимые им соединения из живых клеток хозяина. Патогенные микроорганизмы характеризуются строгой специфичностью – каждый их вид способен вызывать только определенную болезнь с характерными для нее симптомами. Так, холерный вибрион вызывает холеру, туберкулезные микобактерии – туберкулез и т. д.

Многие патогенные микроорганизмы паразитируют только в определенных органах и тканях. Например, возбудители желудочно-кишечных заболеваний размножаются при попадании только в кишечник. Однако есть микроорганизмы, которые могут поражать любой орган или ткань, например стафилококки, вызывающие гнойно-воспалительные процессы, возбудители туберкулеза и др.

Санитарно-показательные микроорганизмы. Быстро и непосредственно обнаружить в объектах внешней среды (воде, воздухе, пищевых продуктах) патогенные микроорганизмы очень трудно, так как их количество ничтожно мало по сравнению с сапрофитной микрофлорой исследуемых объектов. Поэтому возможное загрязнение этих объектов патогенными микроорганизмами определяют косвенно – на основании качественного и количественного учета санитарно-показательных микроорганизмов.

К санитарно-показательным микроорганизмам относятся кишечная палочка, гемолитические (растворяющие эритроциты крови) стрептококки и стафилококки. Они являются постоянными обитателями естественных полостей тела человека и животных (кишечника, слизистых оболочек полости рта и верхних дыхательных путей). Присутствие

санитарно-показательных микроорганизмов в объектах внешней среды указывает на загрязненность их выделениями человеческого организма, а следовательно, и на возможность наличия в них соответствующих патогенных микроорганизмов.

Кишечная палочка (Escherichia coli) является постоянным обитателем толстых кишок, безвредна для человека, но является показателем фекального загрязнения воды и пищевых продуктов выделениями кишечника человека, что свидетельствует о возможном наличии возбудителей тяжелых кишечных заболеваний (дизентерии, брюшного тифа, паратифов и т. п.), которые выделяются из больного организма во внешнюю среду.

Для санитарно-гигиенической оценки воды, пищевых продуктов и других объектов необходимо не только установить наличие в них кишечной палочки, но в ряде случаев провести количественный учет этих бактерий.

Интенсивность фекального загрязнения характеризуется двумя микробиологическими показателями: коли-титром и коли-индексом.

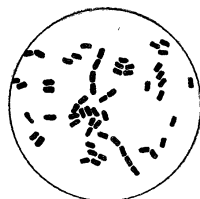


Рисунок 4.7 – *Escherichia coli* (кишечная палочка)

Коли-титр – наименьшее количество исследуемого материала (объем, масса), в котором обнаруживается одна кишечная палочка. Для жидких объектов – воды, сула, вина, пива, напитков – коли-титр выражают в единицах объема; для плотных сред (почвы) – в единицах массы. Чем меньше величина коли-титра, тем опаснее данный объект в эпидемиологическом отношении.

Коли-индекс – это количество кишечных палочек в единице объема (массы) исследуемого вещества (обычно в 1 л или 1 кг).

В последнее время наиболее надежным показателем фекального загрязнения считают содержание энтерококков. Они не размножаются в воде, благодаря чему фекальное происхождение их более достоверно.

Гемолитические стрептококки и стафилококки. Эти постоянно обитающие на слизистых оболочках полости рта и верхних дыхательных путей микроорганизмы также являются санитарно-показательными. Их наличие указывает на обсемененность воздушной среды и некоторых продуктов микрофлорой дыхательных путей, среди которой могут быть возбудители ангины, коклюша, туберкулеза и др., попадающие туда при кашле, чихании и пр.

4.2.3. Общие принципы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности

Задачей микробиологического контроля является быстрое обнаружение микроорганизмов-вредителей, выявление путей их проникновения в производство, предотвращение развития посторонней микрофлоры путем использования различных профилактических мероприятий, уничтожение ее путем дезинфекции с целью получения высококачественной готовой продукции.

Микробиологический контроль должен проводиться заводскими лабораториями систематически. Он осуществляется на всех этапах технологического процесса, начиная с сырья и кончая готовым продуктом, на основании государственных стандартов (ГОСТ), технических условий (ТУ), инструкций, правил, методических указаний и другой нормативной документации, разработанной для каждой отрасли пищевой промышленности.

Микробиологический контроль будет действенным, только если он сочетается с санитарно-гигиеническим контролем, назначение которого – обнаружение патогенных микроорганизмов. Санитарно-гигиенический контроль включает проверку чистоты воды, воздуха производственных помещений, пищевых продуктов, санитарного состояния технологического оборудования, инвентаря, тары, гигиенического

В прессованных дрожжах, поступающих на сушку, определяют содержание влаги и подъемную силу, количество несовершенных дрожжей. Желательно, чтобы подъемная сила была до 60 мин. После сушки в сушеных дрожжах определяют содержание влаги, подъемную силу, кислотность, а также оценивают цвет, запах дрожжей и определяют количество мертвых клеток.

Содержание влаги в сушеных дрожжах должно быть не выше 8–10 %, подъемная сила – 70–90 мин, но не более 110 мин. Цвет – коричнево-желтый, запах – «дрожжевой». Продолжительность хранения в хорошо укупоренной таре от 5 до 12 мес.

5.2.2. Санитарно-гигиенический режим производства дрожжей

Все оборудование и инвентарь дрожжевого завода должны быть исправными и содержаться в чистоте.

Баки-хранилища для мелассы должны быть надежно защищены от попадания атмосферных осадков. Перед загрузкой сырья хранилища следует очистить от остатков старой мелассы и промыть моющими средствами. Если в хранилище находилась сильно обсемененная меласса, то необходимо провести дезинфекцию 3 %-м раствором хлорной извести. В хранящейся мелассе количество микроорганизмов по сравнению с исходным не должно увеличиваться.

При переработке мелассы с повышенной обсемененностью или содержащую опасные для производства микроорганизмы (например, образующие нитриты) ее подвергают пастеризации или мгновенному нагреванию до температуры 120 °С. Применяют также добавку антибиотика биомицина в количестве 5–10 г на 1 м³ мелассного сусла и антисептики (смесь молочной и борной кислот, фурацилин, катапин-П). Антисептики используются для борьбы с нежелательной микрофлорой в приточной мелассе в сочетании с ее нагреванием до 85 °С.

Минеральные соли должны храниться в специальных помещениях, исключающих загрязнение их частицами почвы и микроорганизмами, содержащимися в них.

ма человека, поэтому в небольших дозах (0,001–0,005 %) их применяют для антисептирования сырья, например, мелассы, а также пивоваренного и других видов пищевого оборудования.

Сильным бактерицидным действием обладают многие газообразные вещества (формальдегид, сернистый ангидрид, оксид этилена).

При применении дезинфектантов в процессе обработки оборудования необходимо соблюдать общие правила: применять их только после тщательной механической мойки оборудования; растворы дезинфектантов должны быть свежеприготовленными; после дезинфекции все обработанное оборудование и коммуникации следует тщательно промыть до полного удаления дезинфектанта.

Питьевую воду, а также воду промышленного назначения обычно обеззараживают разнообразными путями – с помощью сильных окислителей (большое количество воды – хлором, малое – соединениями хлора, йодом, ионами тяжелых металлов), путем озонирования, облучения ультрафиолетовыми лучами, обработки гамма-излучением, ультразвуком.

Для дезинфекции воздуха наиболее часто применяют хлорсодержащие препараты и триэтиленгликоль в виде их испарений или аэрозолей. Указанные дезинфектанты снижают общее количество микроорганизмов в воздухе более чем на 90 %. Хорошие результаты для обеззараживания воздуха производственных цехов и холодильных камер дает озонирование и ультрафиолетовое облучение. Периодическое применение физических (вентиляция, фильтрование) и химических способов дезинфекции, очистки и обеззараживания воздуха и сочетание их с влажной уборкой помещений позволяет значительно понизить бактериальную обсемененность воздуха производственных и бытовых помещений.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. На какие группы делятся биохимические процессы, используемые в пищевых технологиях, в зависимости от вида субстрата?
2. Назовите факторы, влияющие на ход спиртового брожения.

3. Назовите основные методы получения спиртового уксуса. Каков общий принцип, положенный в основу этих методов?

4. Изложите механизм процесса гниения в аэробных и анаэробных условиях.

5. В чем заключается специфичность действия патогенных микробов?

6. Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Какова их роль в оценке загрязнения объектов внешней среды?

7. Каковы задачи микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности?

8. Какие микробиологические показатели используются для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов контроля на пищевых предприятиях?

9. Какие существуют виды дезинфекции в пищевой промышленности?

10. В чем отличие между микробицидным и микробостатическим действием антимикробных веществ на микроорганизмы?

ГЛАВА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ

5.1. Микробиология и биохимия дрожжевого производства

5.1.1. История использования микроорганизмов для получения пищевого белка

Структура питания человечества в целом, в том числе населения нашей страны, далеко не идеальна, причем наиболее дефицитным компонентом пищи является белок, особенно белок высокой питательной ценности.

Крупнотоннажное микробиологическое производство белка позволяет расширить и качественно улучшить пищевую базу, получить наиболее высококачественные белковые продукты с наименьшими за-

Наличие посторонней микрофлоры свидетельствует о неудовлетворительном качестве дрожжей ЧК и ЕЧК и их непригодности для использования в качестве засевных.

На стадии выделения товарных дрожжей для учета потерь дрожжей микроскопируют пробы бражки и промывных вод из сепараторов и прессов. В бражке количество дрожжевых клеток должно быть не более 1–2. В воде, отходящей из прессов, дрожжевых клеток быть не должно.

Контроль готовой продукции.

В прессованных дрожжах ЧК и ЕЧК определяют: содержание влаги, кислотность (рН), ферментативную активность (зимазную, мальтазную, подъемную силу). Эти показатели должны соответствовать ГОСТу.

Прессованные дрожжи микроскопируют для оценки их качества по величине и однородности клеток сахаромицетов и с целью выявления посторонней микрофлоры. В случае резкого ухудшения подъемной силы или стойкости готовой продукции определяют степень ее общей обсемененности и присутствие микроорганизмов – вредителей производства. В доброкачественных прессованных дрожжах допускается присутствие кислотообразующих бактерий не более 15–35 %, гнилостных бактерий быть не должно, посторонних дрожжей – не более 30 %.

Показатели качества прессованных и сушеных хлебопекарных дрожжей. Они должны удовлетворять требованиям ГОСТа: иметь светло-серый или желтовато-белый цвет, характерный «дрожжевой» запах, слегка напоминающий фруктовый, консистенция должна быть плотной, дрожжи должны легко ломаться и не мазаться.

Содержание влаги в прессованных дрожжах должно быть не более 75 %, зольность – не выше 2 %.

Основным показателем качества хлебопекарных дрожжей является их подъемная сила. Подъемная сила должна быть не более 75 мин. Стойкость (до момента размягчения бруска дрожжей) – не менее 48 ч при температуре хранения 35 °С и 10 сут при температуре хранения от 0 до 4 °С; мальтазная активность – 60–90 мин, зимазная – 50–60 мин.

10000; мелассы, пригодной для использования – от 10000 до 20000. Меласса считается непригодной, если в 1 г. содержится более 20 000 микроорганизмов.

Если содержание спорообразующих гнилостных бактерий в мелассе составляет 90 % от общего количества микроорганизмов, ее не следует использовать в дрожжевом производстве, так как среди них возможно присутствие нитритообразующих бактерий.

Минеральные соли и кукурузный экстракт. При анализе минеральных солей путем микроскопирования допускается присутствие единичных клеток микроорганизмов.

Для кукурузного экстракта допускается присутствие от 500 до 10000 микроорганизмов в 1 г. Более обсемененный экстракт может стать источником инфекции.

Контроль дрожжей на основных стадиях выращивания. Микробиологическому контролю подлежат дрожжи на всех стадиях размножения. В исходной чистой двухсуточной культуре перед ее разведением определяют:

- однородность дрожжевых клеток – все клетки должны быть одной применяемой расы дрожжей;
- чистоту культуры – посторонних дрожжей и бактерий не должно быть;
- ферментативную активность (зимазную и мальтазную) – она должна соответствовать показателям применяемой расы дрожжей.

На всех стадиях выращивания дрожжей (стадия ЧК, стадия ЕЧК и стадия товарных дрожжей) каждый час отбирают и микроскопируют пробы. При этом отмечают:

- количество почкующихся клеток (в %) – должно быть от 10 до 80 %;
- правильность почкования, содержание мертвых клеток (%) – не должно превышать нескольких долей процента;
- присутствие посторонних дрожжей и бактерий – бактерии и посторонние дрожжи – несхаромиды должны отсутствовать.

тратами труда, с минимальным ущербом для среды, окружающей человека. Микроорганизмы синтезируют белок в 100 000 раз быстрее, чем корова. При этом корова возвращает нам в виде мяса примерно десятую часть питательных веществ, потребляемых ею в виде растительного корма; 90 % корма коровы для питания людей пропадает. У микроорганизмов почти вся масса питательных веществ преобразуется в белки, сахара и жиры, пригодные для использования человеком.

Как промышленный процесс, микробиологическое производство белка не требует посевных площадей, не зависит от климатических и погодных условий, поддается точному планированию и высокому уровню автоматизации, позволяет получать продукцию стандартного качества.

Продукты микробиологического синтеза можно назвать новыми видами пищи. В частности, дрожжи являются ценным источником витаминов группы «В», содержат рибофлавин, фолиевую кислоту, эргостерин, который при облучении ультрафиолетовыми лучами превращается в витамин «Д». Впервые использовать пивные дрожжи в качестве белковых компонентов пищи было предложено в 90-е годы XIX в.

Современная история микробиологического производства белка началась в Германии во время первой мировой войны, где с этой целью использовались хлебопекарные дрожжи. Были разработаны рецептуры добавления выращенных на мелассе дрожжей в различные продукты. Это позволило спасти от голодной смерти тысячи людей. В 1915 г. мощность германских установок по производству дрожжей была доведена до 10 тыс. т, но в 1916 г. выпуск дрожжей прекратили из-за недостатка мелассы.

Во время второй мировой войны в Германии дрожжи пищевого назначения выращивали на гидролизатах древесины. В 1944 г. мощность производства пищевых дрожжей составила 15 тыс.т. Колониальное управление Великобритании – союзника СССР во второй мировой войне – построило на Ямайке завод пищевых дрожжей, благодаря чему наша страна также получала в это время дрожжи для питания людей.

С самого начала промышленного выращивания дрожжей принимались многочисленные попытки осуществить их полунепрерывное или непрерывное производство. Начиная с 30-х годов прошлого века производство дрожжей осуществляется по непрерывному методу, а в качестве единственного источника сырья используется меласса.

Хлебопекарные дрожжи применяют в микробиологической промышленности в качестве сырья для получения витамина «Д» и приготовления питательных сред, в медицинской промышленности – для приготовления лекарств.

5.1.2. Основные стадии технологического процесса

Основная задача дрожжевого производства заключается в получении дрожжей для хлебопекарной промышленности. Содержащийся в дрожжах комплекс ферментов вызывает в тесте спиртовое брожение; выделяющийся при этом диоксид углерода поднимает и разрыхляет тесто.

Клетки дрожжей в процессе роста и размножения потребляют питательные вещества из культуральной среды и синтезируют из них клеточное вещество. Часть питательных веществ, в основном сахаров, затрачивается дрожжами на получение энергии, необходимой для процессов синтеза.

В процессе роста и размножения дрожжевые клетки интенсивно потребляют кислород, для пополнения запасов которого в среду непрерывно подают воздух. При недостатке растворенного кислорода дрожжи переходят на менее экономичный способ добывания энергии – анаэробный. Они начинают разлагать сахара среды с образованием этилового спирта и диоксида углерода (спиртовое брожение); при этом рост клеток значительно замедляется.

Дрожжевые заводы производят прессованные и сухие дрожжи. Прессованные дрожжи – это брикеты светло-серого или светло-желтого цвета с содержанием влаги 73–75 %, представляющие собой биомассу дрожжевых клеток, в 1 г которой содержится от 8 до 12 млрд клеток.

в производстве дрожжей предъявляют те же требования, что и к питьевой. Она должна соответствовать действующему ГОСТу.

Для того чтобы обеспечить энергичное размножение и накопление биомассы хлебопекарных дрожжей, необходимо огромное количество воздуха – от 10 до 80 тыс. м³/ч (в зависимости от мощности завода). В атмосферном воздухе находится значительное количество микроорганизмов, и он может стать дополнительным источником проникновения в производство посторонней микрофлоры. Особую опасность представляют несовершенные дрожжи, имеющиеся в воздухе, для которых условия выращивания хлебопекарных дрожжей очень благоприятны. Поэтому воздух подвергается фильтрованию.

Очагами развития различных посторонних бактерий и несовершенных дрожжей могут стать аппаратура и трубопроводы с остатками питательной среды.

5.2. Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль дрожжевого производства

5.2.1. Микробиологический контроль производства дрожжей

Микробиологический контроль осуществляется путем микроскопирования проб на всех стадиях производства хлебопекарных дрожжей, начиная с контроля сырья, поступающего на переработку, и кончая готовой продукцией.

Контроль сырья. Контроль микробиологической чистоты сырья имеет очень большое значение, поскольку при инфицировании процесса от сырья будут заражены все технологические стадии и фактически вся продукция будет забракована.

Меласса. В ней определяют общее количество микроорганизмов в 1 г, качественный (видовой) состав микрофлоры с целью выявления микроорганизмов – вредителей производства и их процентное соотношение, количественный состав.

Общее количество микроорганизмов в 1 г мелассы хорошего качества не должно превышать 2000; нормального качества – от 1000 до

ную силу и мальтазную активность, хотя иногда выход дрожжей за счет биомассы несовершенных дрожжей увеличивается.

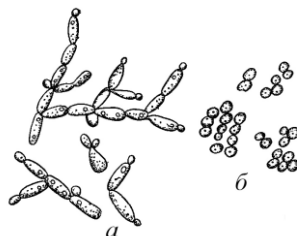


Рисунок 5.3 – Несовершенные дрожжи: а – род *Candida*; б – род *Torulopsis*

Микрофлора минеральных солей и активаторов роста. Суперфосфат, диаммоний фосфат, сульфат аммония, хлорид калия и сульфат магния обычно не содержат микроорганизмов.

Однако при неправильной приемке и хранении на заводе (выгрузка прямо на землю, открытое хранение в россыпях или в непригодных помещениях) может произойти вторичное загрязнение продуктов частичками почвы и, следовательно, микроорганизмами. При использовании таких загрязненных солей в производственный процесс могут проникать спорообразующие гнилостные бактерии, посторонние дрожжеподобные грибы и пр.

Кукурузный экстракт содержит споры мицелиальных грибов, спорообразующие аэробные (сенная палочка) и анаэробные (маслянокислые бактерии), неспорообразующие (сарцина, микрококки). Иногда обнаруживаются дрожжи.

Микрофлора воды и воздуха. Дрожжевое производство характеризуется большим расходом воды. Вода используется для разбавления мелассы, для промывания дрожжей после их отделения от питательной среды, для мойки аппаратуры, регулирования температуры в дрожжерастильных аппаратах. Вода, сильно обсемененная микроорганизмами, может стать серьезным источником инфекции на заводе, поэтому к воде

Сухие дрожжи представляют собой мелкую крупку (гранулы) или «вермишель», содержащие 8–10 % влаги.

Сырьем в производстве хлебопекарных дрожжей являются свеколовичная меласса (отход свеклосахарного производства), минеральные соли, активаторы роста, вода.

Технологический процесс дрожжевого производства (рис. 5.1) состоит из нескольких стадий: подготовка питательной среды, выращивание засевных дрожжей, выращивание товарных дрожжей, выделение, прессование и упаковывание прессованных дрожжей или сушка с последующим упаковыванием сухих дрожжей.

Перед выращиванием дрожжей мелассу сначала разбавляют водой, а затем осветляют, в процессе чего она освобождается от большей части коллоидных частиц, которые могут обволакивать дрожжевые клетки и мешать их развитию, солей кальция, а также от посторонних микроорганизмов.

Затем мелассу подкисляют серной кислотой (до pH 4,5–5), добавляют азот- и фосфорсодержащие соли (сульфат аммония, диаммонийфосфат), а также стимуляторы роста клеток – кукурузный экстракт или вытяжку из солодовых ростков – в которых содержится биотин, поскольку содержание всех этих веществ в мелассе недостаточно для активного размножения дрожжей. Полученная смесь называется мелассным суслом.

Для приготовления засевных (маточных) дрожжей используют чистую культуру специальных рас (штаммов) хлебопекарных дрожжей, которую вначале выращивают в лабораторных условиях, начиная с пробирки, затем – в полупроизводственных условиях – в отделении чистой культуры, постепенно увеличивая ее объем.

В результате получают дрожжи, называемые чистой культурой (ЧК), или маточными дрожжами А. Процесс размножения чистой культуры ведут при температуре 25–30 °С, питательную среду подкисляют до pH 4,8–5,8.

Питательная среда непрерывно аэрируется по воздушно-

приточному способу, так как только при доступе кислорода дрожжи используют сахара мелассы не на спиртовое брожение, а на энергичное размножение и накопление значительной биомассы физиологически активных, жизнеспособных дрожжевых клеток.

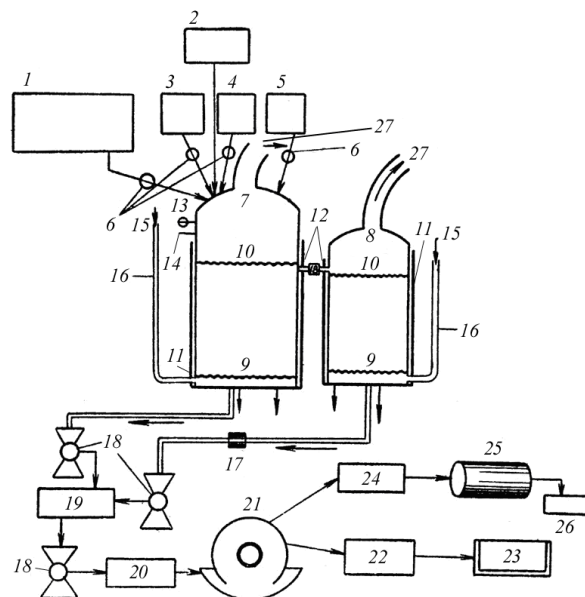


Рисунок 5.1 – Схема производства хлебопекарных дрожжей
1 – мелассное сусло, 2 – засевные дрожжи; 3, 4, 5 – питательные соли, биотин; 6 – дозаторы, 7 – дрожжерастильный аппарат (основной); 8 – дображиватель; 9 – воздухораспределительные системы, 10 – уровень жидкости, 11 – водяная рубашка; 12 – вывод воды; 13 – подача воды в аппарат, 14 – подача пеногасителя, 15 – подача воздуха, 16 – подача пара, 17 – расходомер, 18 – сепараторы, 19, 20 – сборники для дрожжевого концентрата, 21 – вакуум-фильтр, 22 – формовка и упаковка прессованных дрожжей, 23 – холодильная камера, 24 – дрожжеформовочная машина; 25 – сушилка, 26 – охлаждение и упаковка сушеных дрожжей, 27 – отвод отработанного воздуха

дрожжей. Нитриты образуются чаще всего при недостаточной аэрации среды, поэтому появление нитритов в дрожжерастильных аппаратах является косвенным показателем недостаточности аэрации.

Неспороносные гнилостные бактерии представлены многими представителями рода *Pseudomonas*, а также кишечной палочкой, микрококками. Все они снижают выход дрожжей и их качество, вызывают разложение белков дрожжей, что приводит к быстрой порче прессованных дрожжей (разжижению) и появлению неприятно пахнущих продуктов гниения (сероводорода, индола, скатола и др.).

Молочнокислые бактерии наносят немалый вред дрожжевому производству. Кислообразующие бактерии, в частности *Leuconostoc mesenteroides* которые стгущают приточную мелассу, что затрудняет ее поступление в дрожжерастильные аппараты. В дрожжерастильных аппаратах иногда развивается другой вид молочнокислых бактерий – *Leuconostoc agglutinans*. Он склеивает (агглютинирует) дрожжевые клетки в комки, которые оседают на дно аппаратов. При этом размножение дрожжей почти прекращается а, следовательно, снижается их выход и ухудшается товарный вид. Бороться с этими бактериями очень трудно, поскольку слизистые капсулы ограждают клетки от воздействия температуры и дезинфицирующих веществ. Прессованные дрожжи, выращенные в присутствии лейконостока, имеют комковатую структуру. Подъемная сила и мальтазная активность у них низкая.

Несовершенные дрожжи встречаются наряду с бактериальной микрофлорой в мелассе. В основном это дрожжи родов *Candida* и *Torulopsis* (рис. 5.3). Они попадают в мелассу из воды, воздуха, аппаратуры. В дрожжерастильные аппараты они проникают с приточной мелассой и размножаются при тех же температурных условиях и значениях pH, которые благоприятны для производственной культуры дрожжей

Скорость роста и почкования несовершенных дрожжей в несколько раз больше, чем у основной культуры хлебопекарных дрожжей.

Наличие в готовой продукции несовершенных дрожжей снижает стойкость прессованных дрожжей, ухудшает их консистенцию, подъем-

нию сахарозы стойка при хранении, поскольку микроорганизмы находятся в ней в недействительном состоянии. При длительном хранении в соответствующих условиях в закрытых хранилищах количество микроорганизмов постепенно уменьшается вследствие отмирания видов, менее устойчивых к осмотическому давлению. Однако если в процессе хранения мелассы в нее попадают дождевые воды, то количество микроорганизмов в разбавленном поверхностном слое может резко возрасти. Из верхних слоев микроорганизмы распространяются по всей толще мелассы, и в результате их жизнедеятельности изменяется ее химический состав (уменьшается содержание сахара, накапливаются вредные продукты обмена веществ микроорганизмов). При переработке сильно инфицированной мелассы посторонние микроорганизмы могут распространиться по всему производству.

Микрофлора мелассы состоит в основном из многих видов бактерий и несовершенных дрожжей. Наибольшую опасность для дрожжевого производства представляют некоторые группы микроорганизмов, обнаруживаемые не только в мелассе, но и в готовых прессованных дрожжах.

Спорообразующие бактерии представлены в основном почвенными бактериями (сенная палочка *Bacillus subtilis*, *B. mycoides* и др.). Они относятся к гнилостным бактериям, могут размножаться как в осветленной приточной мелассе, так и вместе с дрожжами в дрожжерастильных аппаратах.

Спорообразующие бактерии наносят значительный ущерб производству, так как в процессе жизнедеятельности не только используют сахар и другие питательные вещества среды, но и восстанавливают содержащиеся в мелассе нитраты в ядовитые для дрожжей нитриты, малые дозы которых задерживают нормальное почкование дрожжевых клеток. По мере увеличения концентрации нитритов накопление биомассы дрожжей снижается на 40–50 %. Стойкость дрожжей при хранении под влиянием нитритообразующих бактерий снижается, они вызывают разложение дрожжевых белков и разжижение прессованных

Дрожжи ЧК служат засевным материалом для приготовления естественно чистой культуры (ЕЧК), или маточных дрожжей Б. Дрожжи ЕЧК используют в качестве маточных для получения товарных дрожжей.

Выращивание товарных дрожжей осуществляют в дрожжерастильных аппаратах. Имеются различные технологические схемы (периодическая, полунепрерывная и непрерывная) для получения товарных прессованных дрожжей (дрожжи В). Главное направление в современной технологии – выращивание дрожжей на концентрированных средах, содержащих 5–6 % сахара. Это улучшает качество дрожжей и повышает производительность дрожжерастильных аппаратов.

Чтобы обеспечить нормальное размножение дрожжей, среду аэрируют большим количеством воздуха (100–120 м³/ч воздуха на 1 м³ среды). После накопления в аппарате определенного количества дрожжевых клеток и заполнения его на полную полезную емкость (через 6–7 часов после начала процесса) начинается отток среды вместе с дрожжами в соседние аппараты – дображиватели. По окончании процесса выращивания дрожжей культуральную жидкость сепарируют, получают дрожжевое молоко, содержащее 500–600 г/л дрожжей, и бражку. Дрожжевое молоко поступает на промывание холодной водой для удаления остатков бражки, после чего дрожжи вновь поступают на сепарирование. Промывание и сепарирование повторяют 2–3 раза, пока клетки дрожжей не будут окончательно освобождены от бражки.

Промытые и отсепарированные дрожжи при помощи насоса подаются в вакуум-фильтр, где они прессуются, а далее формуются в виде брусков. Их завертывают в бумагу с этикеткой завода, укладывают в ящики и направляют в холодильные камеры, где охлаждают до 4 °С.

Сушеные дрожжи получают высушиванием прессованных дрожжей теплым воздухом до остаточного содержания влаги 8–10 %. Для ускорения сушки дрожжи вначале измельчают в специальной дрожжеформовочной машине до получения короткой тонкой «вермишели» или гранул. Благодаря низкому содержанию влаги сушеные

дрожжи, в отличие от прессованных, могут долго сохраняться. Сушка в некоторой степени угнетает дрожжи, поэтому применяются мягкие температурные режимы – (30–40) °С. После сушки продукцию охлаждают до 15–16°С и упаковывают.

5.1.3. Особенности культур дрожжей, используемых в производстве

Для производства прессованных хлебопекарных дрожжей используют различные расы дрожжей-сахаромикетов вида *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 5.2). По характеру брожения это верховые дрожжи; при брожении они долго не опускаются на дно и частично поднимаются на поверхность бродящей жидкости в виде пены. Эти расы имеют крупные клетки, которые быстро размножаются в мелассной питательной среде, стойкие при хранении в прессованном и сушеном виде, обладают высокой ферментативной (мальтазной и зимазной) активностью.

Мальтазная активность – это время (в мин), необходимое для выделения 10 мл СО₂ при сбраживании 10–20 мл 5 %-го раствора мальтозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды.



Рисунок. 5.2 – Хлебопекарные дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*

Мальтазная активность характеризует способность дрожжей гидролизовать мальтозу муки и зависит от присутствия в дрожжах фермента мальтазы. Мальтоза – основной сахар теста; она сбраживается дрожжами более медленно, чем другие сахара, так как дрожжи содержат

сравнительно мало мальтазы. Мальтазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 100 мин.

Зимазная активность – это время (в мин), необходимое для выделения 10 мл СО₂ при сбраживании 10–20 мл 5 %-го-раствора глюкозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Зимазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 60 мин.

Подъемной силой называется период времени (в мин), в течение которого тесто, замешенное на испытуемых дрожжах, поднимается до определенного уровня в формочке. Для дрожжей хорошего качества этот показатель должен составлять не более 75 мин; уровень подъема теста – 70 мм.

Производственные расы, используемые для получения сухих дрожжей кроме перечисленных выше свойств должны обладать устойчивостью к высушиванию.

5.1.4. Микроорганизмы – вредители дрожжевого производства

Источниками попадания посторонней микрофлоры в производство дрожжей являются сырье, минеральные соли, ростовые вещества (кукурузный экстракт, солодовые ростки), засевные дрожжи, вода, воздух, технологическое оборудование. Развиваясь совместно с дрожжами, посторонние микроорганизмы неблагоприятно влияют на технологический процесс, снижают выход и качество готовой продукции.

Поскольку технологическое оборудование представляет одинаковую опасность в микробиологическом отношении для различных пищевых производств, и как источник посторонней микрофлоры было рассмотрено ранее (гл. 4), то в данной главе рассматриваться не будет.

Микрофлора мелассы. Она очень многообразна и изменчива. В 1 г нормальной мелассы содержится от 1000 до 10000 микроорганизмов. Они попадают в мелассу из свеклы, и в процессе производства сахара – из аппаратуры, воды, воздуха.

Натуральная меласса благодаря высокому (около 50 %) содержа-

тары – бутылок, бочек, обсемененность готового продукта и др. Устанавливаются нормы обсемененности каждого объекта. Так, например, количество микроорганизмов в последних смывных водах после дезинфекции оборудования должно приближаться к числу клеток в воде, используемой для обработки. Бактерии кишечной группы в 100 см³ смывной воды должны отсутствовать.

6.2.2. Санитарно-гигиенический режим пивоваренного производства

Качество пива в значительной степени определяется уровнем санитарного состояния производства по всему технологическому процессу. Санитарно-гигиенические требования предусматривают на всех участках производства проведение профилактических мероприятий по предотвращению микробиологической загрязненности сырья, полупродуктов и готовой продукции.

Хранение ячменя. Помещение для хранения зерна является наиболее запыленным участком производства. Поэтому санитарные правила предусматривают установление пылеуловителей и вентиляторов, а также уборку помещения в каждую смену.

Перед поступлением новой партии ячменя складские помещения должны быть тщательно очищены от мусора, пыли, остатков старого зерна и дезинфицированы. Оборудование и территорию склада также очищают от мусора и зерна.

Мешки с ячменем располагают так, чтобы к ним имелся доступ воздуха. Нижний ряд мешков складывают на стеллажи на высоте 25–30 см от пола. В силосные емкости загружают ячмень с содержанием влаги не выше 12–15 % и регулярно их проветривают.

Солодовенный цех. Санитарные мероприятия при приготовлении солода направлены в основном на борьбу с зерновой пылью, механическими примесями, микроорганизмами.

Ячмень, поступающий на замачивание, после тщательной мойки рекомендуется дезинфицировать негашеной известью, хлорной изве-

Кукурузный экстракт необходимо хранить в специальных закрытых емкостях, которые перед загрузкой должны быть тщательно очищены от остатков продукта, промыты водой и пропарены (при сильном загрязнении следует применить дезинфицирующие средства). Сильно инфицированный экстракт перед использованием разбавляют водой в соотношении 1:1 и паром прогревают до температуры 90–95 °С.

Дезинфекцию оборудования проводят только после удаления из него питательной среды, дрожжей и тщательной мойки. В качестве моющих средств используются каустическая и кальцинированная сода, а в качестве дезинфицирующих средств для борьбы с посторонними микроорганизмами – хлорная известь, формалин, газообразный формальдегид, гипохлорид кальция.

После мойки и дезинфекции оборудование (дрожжерастильные аппараты и другие емкости) тщательно промывают водой до полного удаления моющего средства и дезинфектанта. Проверку эффективности обработки производят путем микроскопирования последней смывной воды.

Дрожжерастильные аппараты очищают, промывают горячей водой и дезинфицируют 3 %-м раствором хлорной извести, а после отмывания дезинфицирующего раствора пропаривают. Особое внимание обращают на проведение обработки и дезинфекции воздухораспределительной системы, в которой могут сохраниться остатки питательной среды и дрожжей, благоприятствующие развитию посторонних микроорганизмов. Они могут стать причиной загрязнения и порчи готовой продукции. Воздухораспределительную систему заполняют раствором дезинфектанта на определенное время, а затем тщательно промывают. Подаваемый в дрожжерастильные аппараты воздух не должен содержать пыль и микроорганизмы, способные размножаться в аппаратах (в основном несовершенные дрожжи и гнилостные бактерии). Поэтому забор воздуха производят выше крыши заводского здания, а для его очистки должны быть установлены фильтры, задерживающие пыль и микроорганизмы.

Дрожжевые сепараторы, промывные чаны, сборники для стуженого дрожжевого концентрата, фильтр-пресса, вакуум-фильтры необходимо регулярно (1 раз в смену) подвергать чистке и мойке. Особенно тщательно моют и дезинфицируют сепараторы, предназначенные для выделения засевных дрожжей чистой культуры (ЧК) и естественно чистой культуры (ЕЧК).

Все трубопроводы после окончания работы промывают холодной водой и пропаривают в течение 20–30 мин.

Не реже одного раза в месяц или же в случае появления посторонней микрофлоры в дрожжерастильных аппаратах, а также перед приготовлением маточных дрожжей трубопроводы заполняют 1 %-м раствором каустической соды или 2 %-м раствором антиформина на 8–12 ч. Затем растворы сливают, трубопроводы промывают водой и пропаривают.

Очистку и дезинфекцию бункеров для запаса формируемых дрожжей производят ежедневно.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. В чем преимущества получения пищевого белка микробиологическим способом по сравнению с традиционным получением животного и растительного белка?
2. Назовите основные стадии производства хлебопекарных дрожжей.
3. Какой вид дрожжей используется в качестве чистой культуры в производстве хлебопекарных дрожжей? Назовите основные микробиологические характеристики этих дрожжей.
4. Назовите источники проникновения посторонней микрофлоры в производство дрожжей.
5. Какое нарушение технологического режима характеризует развитие спорообразующих бактерий в дрожжерастильном аппарате?
6. Какую опасность для производства хлебопекарных дрожжей представляют молочнокислые бактерии и несовершенные дрожжи?
7. Какой метод микробиологического контроля используется в

стерильно, и его инфицирование происходит при охлаждении. На анализ отбирают пробы сусла из аппаратов для охлаждения, коммуникаций и бродильных емкостей. Определяют стойкость сусла, общую обсемененность сусла микроорганизмами, наличие кислотообразующих бактерий и коли-титр. Общая обсемененность сусла является критерием при оценке его биологического состояния, однако решающее значение имеет наличие бактерий, способных развиваться в готовом пиве.

Контроль молодого пива. Анализ молодого пива проводят в случае нарушения нормального хода главного брожения с целью выявления причин нарушения. В настоящее время за 7 сут до окончания дображивания, когда практически осели все дрожжи, отбирают пробы пива и определяют его биологическую стойкость. Появление пленки, осадка, гнилостного или кислого запаха через 2–3 сут. свидетельствует о повышенной обсемененности сусла посторонними микроорганизмами и о плохой санитарной обработке танков. Такой анализ помогает прогнозировать качество готового пива.

Контроль готового пива. Готовое пиво проверяют на биологическую стойкость и определяют общее число микроорганизмов и наличие бактерий кишечной группы. Биологическая стойкость каждого сорта пива характеризуется временем (в сут.), в течение которого не происходит развитие в нем микрофлоры. Если стойкость ниже, чем предусмотрено стандартами, то необходимо определить общее число микроорганизмов в готовом пиве. В 1 мл пива не должно быть более 100 клеток посторонних микроорганизмов.

Не реже одного раза в месяц в каждом сорте пива определяют бактерии кишечной группы – их присутствие недопустимо

Контроль воды и материалов. Объектами микробиологического контроля пивоваренного производства, как и всех других пищевых производств, являются смывные воды, фильтрующие материалы, тара, упаковочный материал. Пробы отбирают из аппаратуры для охлаждения сусла, бродильных емкостей, коммуникаций. В лагерном и разливочном отделениях анализируют промывные воды из танков, качество мойки

неспоробразующие дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и др.

Дикие дрожжи обычно встречаются в меньших количествах, чем бактерии.

6.2. Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль пивоваренного производства

6.2.1. Микробиологический контроль производства пива

Микробиологический контроль осуществляется на всех технологических стадиях и включает контроль дрожжей, сусла, молодого пива, готового пива.

В пивоваренном производстве определяют общее количество микроорганизмов и бактерии кишечной группы.

Контроль пивных дрожжей. При производстве пива одной из самых ответственных технологических стадий является подготовка пивных дрожжей к брожению. Состояние дрожжевой культуры не только определяет качество пива, но и лимитирует скорость главного брожения.

Пивные дрожжи из аппарата для разведения чистой культуры перед подачей в цех брожения анализируют на присутствие в них посторонних микроорганизмов и мертвых клеток дрожжей. Если анализ показывает наличие посторонних микроорганизмов, то разводят новую чистую культуру из пробирки.

Производственные (семенные) дрожжи исследуют ежедневно из каждой ванночки: проверяют морфологию клеток, содержание мертвых клеток, определяют присутствие посторонних микроорганизмов. В производственных дрожжах, используемых несколько раз, количество мертвых клеток дрожжей не должно превышать 5 %, а количество бактерий – 0,5 % от общего числа клеток дрожжей. Присутствие диких дрожжей недопустимо. Если семенные дрожжи не соответствуют указанным показателям, то они подлежат антисептической обработке персульфатом аммония.

Контроль сусла. Сусло сразу после кипячения с хмелем обычно

производстве хлебопекарных дрожжей?

8. Какие микробиологические показатели определяют на стадиях выращивания дрожжей ЧК, ЕЧК и стадии получения товарных дрожжей?

9. Каким показателям качества должны удовлетворять готовые прессованные и сушеные дрожжи?

10. Каков порядок проведения дезинфекции основного оборудования: дрожжерастильных аппаратов, сепараторов, фильтр-прессов.

ГЛАВА 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ

6.1. Микробиология и биохимия пивоваренного производства

Пиво – слабоалкогольный напиток – получают путем сбраживания охмеленного сусла специальными расами дрожжей. Вкус и аромат пива обуславливают содержащиеся в нем экстрактивные вещества, извлеченные из зернопродуктов, горькие и ароматические вещества хмеля, а также спирт и диоксид углерода, образующиеся при брожении сусла. Насыщенность пива диоксидом углерода придает ему свойство хорошо утолять жажду.

В готовом продукте содержится около 90 % воды, 2,8–6 % спирта, примерно 0,3 % диоксида углерода и 5–10 % экстрактивных веществ. Сырьем для производства пива служат ячмень, хмель и вода, причем в пивоваренном производстве применяют только специально выведенные сорта ячменя.

6.1.1. Сырье и основные стадии технологического процесса

Технология пива включает следующие стадии: производство солода, приготовление пивного сусла, брожение пивного сусла, осветление и розлив пива. Принципиальная схема производства пива представлена на рис.6.1.

Основным сырьем для приготовления пива является солод, который производят из высококачественных пивоваренных сортов ячменя. Для производства солода ячмень замачивают, проращивают в определенных условиях и сушат.

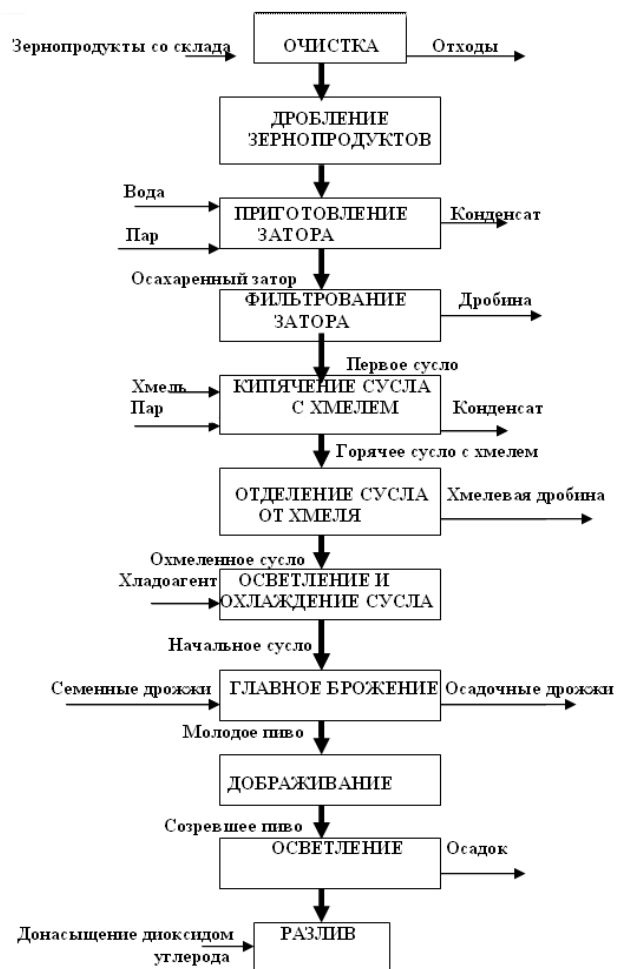


Рисунок 6.1 – Схема производства пива

Рисунок 6.3– Бактерия рода *Zymomonas*



Рисунок 6.4 – Дрожжи рода *Brettanomyces*

Бактерия *Zymomonas anaerobia* (рис.6.3) также развивается в сусле, образуя спирт, органические кислоты, ацетальдегид и CO_2 . Эта бактерия может испортить пиво в течение нескольких часов.

Бактерии кишечной группы очень быстро развиваются в сусле и образуют большое число продуктов, влияющих на вкус и аромат пива. Пиво становится сладковатым с фруктовым привкусом или приобретает запах вареной капусты; иногда образуется сероводород. Наличие бактерий кишечной группы является показателем санитарного состояния завода.

Дикие дрожжи. В пивоваренном производстве встречаются дрожжи, которые могут вызывать существенные изменения биохимических и органо-лептических свойств пива. Их называют *дикими*. При развитии диких дрожжей образуются высшие спирты, эфиры летучих кислот, горькие вещества, придающие суслу и пиву посторонний запах (фруктово-эфирный, лекарственный и др.), неприятные горечь и вкус и вызывающие сильное помутнение, образование осадка.

Среди дрожжей-вредителей встречаются истинные дрожжи-сахаромицеты, отличающиеся по физиологическим признакам от культурных пивных дрожжей. К ним относятся дрожжи родов: *Saccharomyces*, *Brettanomyces* (рис. 6.4), *Torulopsis*. Реже встречаются

«шелковистую муть», повышают кислотность пива, сбраживая сахара в основном в молочную кислоту.

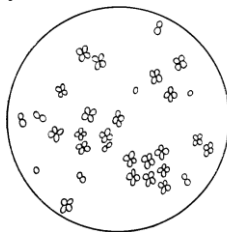
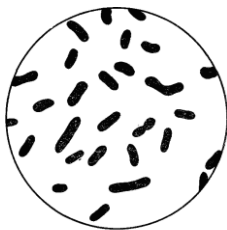


Рисунок 6.2 – Бактерии рода *Pediococcus*

Кокковидные бактерии рода *Pediococcus* (сарцины) (рис. 6.2), вызывая так называемое «сарцинное заболевание» пива. Пиво приобретает неприятный вкус и медовый запах. Наиболее опасным среди педиококков является вид *P. cerevisiae*, который образует большое количество молочной кислоты, вызывая быстрое прокисание пива.

Уксуснокислые бактерии родов *Acetobacter* и *Acetomonas* также встречаются в пивоваренном производстве. Бактерии рода *Acetomonas* окисляют спирт только до уксусной кислоты, а бактерии рода *Acetobacter* – до CO_2 и воды.

В пиве уксуснокислые бактерии начинают размножаться даже при низком содержании кислорода. Способствуют их развитию неполный налив бутылок и бочек, неплотная укупорка. Уксуснокислые бактерии наряду с молочнокислыми являются наиболее частой причиной изменения кислотности и вкуса пива, помутнения и появления пленки на поверхности пива в бутылке.



В процессе солодоращения в зерне накапливаются активные амилолитические и протеолитические ферменты. Свежепроросший солод сушат при повышенной температуре для накопления в нем ароматических веществ, придающих пиву характерные вкус и запах.

В пивоварении в качестве сырья используют и *несоложенные* материалы: ячмень, кукурузу, рис, глюкозный и ячменный сиропы, крахмальную патоку, тростниковый сахар-сырец и др.

Приготовление сусла является сложной технологической стадией. Дробленный солод смешивают с теплой водой; при этом происходит ферментативное расщепление крахмала, белков и других веществ, а также экстрагирование растворимых веществ водой. Приготовление сусла производят в несколько этапов, регулируя температуру и создавая лучшие условия для действия амилолитических и протеолитических ферментов. Под их действием около 75 % сухого вещества солода переходит в раствор.

В случае использования несоложенного сырья в пивоварении на стадии варки сусла вносятся ферментные препараты микробного происхождения.

Отфильтрованное пивное сусло кипятят с хмелем. При этом происходит коагуляция белков, инактивация ферментов, стерилизация сусла, а также охмеление сусла – экстрагирование горьких и ароматических веществ из хмеля, которые обладают бактерицидным действием.

Спиртовое брожение сахаров сусла под действием ферментов дрожжей – основной процесс в технологии пива, он подразделяется на две стадии: главное брожение и дображивание.

Главное брожение протекает в бродильных чанах или танках. В зависимости от вида применяемых дрожжей брожение может быть *низовым*, протекающим при температуре 6–10 °С, и *верховым*, протекающим при 14–25 °С. Наиболее распространенным является низовое брожение. Главное брожение проводят при атмосферном давлении; продолжительность процесса – 7–10 сут. В результате получают молодое пиво – напиток со своеобразным вкусом и ароматом, содержащим небольшое коли-

чество дрожжей. Основная масса дрожжей оседает в конце главного брожения на дно сосуда.

Дображивание и созревание молодого пива протекает в герметически закрытых аппаратах при пониженной температуре 0–2 °С под избыточным давлением 0,03–0,07 МПа в течение 21–90 сут.

При дображивании и созревании в молодом пиве происходят сложные биохимические и физико-химические процессы, в результате которых пиво приобретает свои товарные свойства. Готовое пиво осветляют сепарированием или фильтрованием, охлаждают, дополнительно насыщают диоксидом углерода и разливают в тару.

В последнее время применяется технология брожения сусла и дображивания молодого пива в одном вертикальном аппарате – цилиндрикоконическом танке (ЦКТ).

Совершенная система охлаждения и хорошая тепловая изоляция дают возможность регулировать заданный температурный режим во время процесса и сократить продолжительность цикла брожения и дображивания в ЦКТ в два раза.

Кроме того, разработаны различные способы брожения сусла и дображивания молодого пива в непрерывном потоке, позволяющие также сократить длительность этих технологических стадий.

6.1.2. Характеристика производственных дрожжей

Для производства пива используются специальные расы дрожжей-сахаромицетов, относящихся к видам *Saccharomyces carlsbergensis* (дрожжи низового брожения) и *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи верхового брожения). Дрожжи низового брожения широко используются в пивоварении для приготовления стандартного и сортового пива. Для темных и специальных сортов пива применяют дрожжи верхового брожения.

В пивоварении используют чистые культуры дрожжей, которые размножают (разводят) сначала в лаборатории, а затем – в цехе в специальных аппаратах. Процесс разведения заключается в увеличении массы

тие мицелиальных грибов.

Источником микроорганизмов является и другое сырье, используемое в пивоварении: ячмень, хмель, кукуруза, рис, сахар и др.

Производственные (семенные) дрожжи при их недостаточной биологической чистоте могут служить опасным источником инфекции. При повторном применении дрожжей с каждой следующей генерацией их биологическое состояние, как правило, ухудшается, так как на поверхности клеток дрожжей адсорбируются клетки посторонних микроорганизмов (бактерий и диких дрожжей).

Бактерии, инфицирующие производственные дрожжи, представлены в основном молочнокислыми бактериями и бактериями кишечной группы. Кроме того, в значительных количествах обнаруживаются уксуснокислые бактерии.

Микроорганизмы, инфицирующие пиво. Важным показателем качества пива является *биологическая стойкость* – его способность противостоять помутнению, причиной которого является развитие микроорганизмов. Порчу пива могут вызвать культурные пивные дрожжи, оставшиеся в небольших количествах в результате некачественного сепарирования или фильтрования. При развитии в готовом пиве они образуют рыхлый осадок на дне бутылки, придают пиву дрожжевой привкус и портят его товарный вид.

Более опасными для качества пива являются посторонние микроорганизмы. Они вызывают помутнение пива, повышают кислотность, изменяют аромат и вкус, делая его непригодным к употреблению. Посторонние микроорганизмы, развивающиеся в пиве, принадлежат к бактериям и дрожжам. Это в основном спирто- и кислотоустойчивые микроорганизмы, нечувствительные к антисептическому действию хмеля.

Основными вредителями пивоваренного производства являются молочнокислые, уксуснокислые бактерии, бактерии кишечной группы, дикие дрожжи и др.

Молочнокислые бактерии, встречающиеся в пиве, относятся к родам *Lactobacillus* и *Pediococcus*. Они вызывают помутнение, образуя

состава и физико-химического состояния. Хмелевые смолы и низкое значение pH оказывают бактерицидное действие на некоторые микроорганизмы. Недостаток кислорода, избыточное давление диоксида углерода, присутствие спирта, низкая температура и другие факторы тормозят развитие многих микроорганизмов-вредителей. Однако некоторые микробы, проникая в пиво, насыщенное CO_2 , могут развиваться в нем, вызывая изменения органолептических свойств, образуя муть и повышая кислотность.

Посторонние микроорганизмы могут попадать в пивоваренное производство из воздуха, воды, сырья, производственных культур, дрожжей, оборудования, тары и от персонала. В данной главе не будет рассматриваться микрофлора оборудования, воды, воздуха, тары, поскольку их опасность в микробиологическом отношении одинакова для всех пищевых производств и была рассмотрена ранее (гл. 4).

Микрофлора сырья. Основным сырьем для производства пива является *солод*, качество которого зависит от качества ячменя. На поверхности и под оболочкой ячменя обнаруживаются как бактерии, так и мицелиальные грибы. Общее количество микроорганизмов, главным образом бактерий, составляет десятки и сотни тысяч клеток в 1 г свежеубранного доброкачественного зерна. Мицелиальные грибы составляют 1–2 % от общего количества микроорганизмов.

В процессе производства солода грибы интенсивно развиваются, потребляют питательные вещества и вырабатывают продукты, отрицательно влияющие на свойства солода: он темнеет, снижается его ферментативная активность, что затрудняет процесс осахаривания. Качество сусла и пива, полученных из такого солода, значительно ухудшается. Пиво приобретает посторонние привкус и аромат, содержит токсины и имеет тенденцию к фонтанированию, т. е. чрезмерному пенообразованию.

При хранении ячменя, особенно в неблагоприятных условиях (при повышенной влажности и температуре), происходит количественное и качественное изменение микрофлоры, наблюдается интенсивное разви-

дрожжей от одной пробирки до массы, необходимой для внесения в бродильный аппарат.

Дрожжи в производстве пива используют до 10–12 раз, причем после каждого цикла брожения их возраст (генерация) увеличивается. Такие производственные (семенные) дрожжи перед повторным использованием специально подготавливают (промывают и активируют).

Дрожжи, применяемые в пивоварении, принято называть культурными, поскольку они обладают особыми признаками, приобретенными в результате длительного разведения (культивирования) в определенных технологических условиях. Для получения высококачественного пива дрожжи должны обладать следующими свойствами:

- высокой бродильной активностью; дрожжи активно сбраживают глюкозу и фруктозу, медленнее – мальтозу и еще медленнее – трисахарид мальтотриозу. Декстрины не сбраживаются, но играют важную роль в создании полноты и вкуса пива;
- флокуляционной способностью – медленно и полно оседать на дно бродильных аппаратов;
- умеренной способностью к размножению;
- стойкостью к неблагоприятным условиям и к инфицированию;
- стабильностью морфологических и физиологических свойств и способностью придавать пиву характерные вкус и аромат.

Бродильная активность пивных дрожжей является самым важным свойством и зависит как от биологических свойств дрожжей, так и от внешних условий. Бродильную активность определяют по степени сбраживания сусла. *Степень сбраживания V (%)* – это показатель, характеризующий отношение массы сброженного экстракта ($E - e$) к массе сухого вещества в начальном сусле E :

$$V = (E - e)100 / E,$$

где e – содержание в пиве экстрактивных веществ, % к массе пива.

По степени сбраживания дрожжи делят на сильно- или высоко-

сбраживающие (степень сбраживания 90–100 %), средне-сбраживающие (степень сбраживания 80–90 %) и слабо- или низкосбраживающие (степень сбраживания менее 80 %).

Степень сбраживания зависит от способности дрожжей использовать углеводы сусла. Сбраживаемые сахара составляют 70–80 % массы сусла. Они сбраживаются пивными дрожжами в определенной последовательности, что обусловлено скоростью их проникновения в дрожжевую клетку. В первую очередь дрожжи сбраживают фруктозу и глюкозу, а затем – сахарозу, которая предварительно гидролизуеться до глюкозы и фруктозы. После этого дрожжи сбраживают мальтозу, которая также гидролизуеться до глюкозы. Сбраживание мальтотриозы начинается позднее, чем сбраживание мальтозы. В основном мальтотриоза сбраживается на стадии дображивания.

Флокуляционная способность – это свойство дрожжей оседать в конце главного брожения, что обуславливает осветление молодого пива и готового пива в конце дображивания. Способность дрожжей к флокуляции обусловлена строением клеточной стенки. На флокуляционную способность влияют и внешние факторы (состав сусла, температура, аэрация и др.). Задерживает флокуляцию повышение концентрации в сусле сбраживаемых сахаров, особенно мальтозы. Благоприятствует флокуляции низкая температура брожения и присутствие солей кальция.

Флокулируют дрожжи как низового, так и верхового брожения, однако характер флокуляции разный. Различие во флокуляционных свойствах дрожжей лежит в основе их деления на хлопьевидные и пылевидные.

Хлопьевидные дрожжи низового брожения в конце главного брожения слипаются в комки (хлопья, флокулы) и оседают на дно, образуя осадок. У дрожжей верхового брожения хлопья поднимаются на поверхность, образуя «шапку». *Пылевидные* дрожжи в течение всего процесса брожения остаются во взвешенном состоянии.

Способность дрожжей к размножению имеет очень важное значение в пивоварении. В процессе брожения биомасса дрожжей увеличи-

вается обычно в 3–4 раза. Активное размножение дрожжей нежелательно, так как оно приводит к быстрому расходу экстракта сусла и к образованию в больших количествах побочных продуктов.

В связи с тем, что в производстве пива дрожжи используют неоднократно, они должны характеризоваться *стабильностью морфологических и физиологических свойств*. Особенно это касается таких важных свойств, как жизнеспособность, бродильная активность и флокуляционная способность. У производственных дрожжей регулярно проверяют морфологию клеток, содержание мертвых клеток, наличие гликогена, способность к размножению, брожению и оседанию.

Стойкость дрожжей к неблагоприятным условиям – недостатку питательных веществ, повышению температуры, изменению кислотности, инфицированию посторонними, вредными для пива микроорганизмами – должна быть высокой.

Пивные дрожжи в процессе спиртового брожения способны накапливать в сусле большое количество продуктов, в результате чего образуется специфический пищевой продукт, обладающий приятными ароматическими и вкусовыми свойствами. Кроме этилового спирта и диоксида углерода (основных продуктов брожения) наиболее важным в количественном и качественном отношении является образование альдегидов, органических кислот, эфиров, высших спиртов, которые определяют вкус и аромат пива.

Производство пива ведется в нестерильных условиях, поэтому отдельные стадии технологического процесса инфицируются различными микроорганизмами, вызывающими порчу готовой продукции.

6.1.3. Микроорганизмы – вредители пивоваренного производства

Посторонние микроорганизмы, развиваясь в сусле и пиве, приводят к появлению запаха и вкуса, несвойственных для пива, и к снижению его качества. Естественная устойчивость бродящего сусла к воздействию микроорганизмов обусловлена особенностями его химического

Навчальне видання

ЗІНЧЕНКО Марія Георгіївна

**БІОХІМІЧНІ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ХАРЧОВОЇ І
БРОДИЛЬНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ**

Навчальний посібник

Російською мовою

Роботу рекомендував до видання В.І. Тошинський

Редактори М.П. Єфремова
О.І Шпільова

План 2007р., поз. 97/

Підп. до друку __.__.08. Формат 60×84 1/16. Папір друк. Друк – ризографія. Гарнітура Times. Ум. друк. арк. 9,8. Наклад 100 прим. Зам. № __.
Ціна договірна

Видавничий центр НТУ «ХП»
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000р.
61002, Харків, вул.. Фрунзе, 21

Друкарня НТУ «ХП». 61002, Харків, вул.. Фрунзе, 21

стью, формалином или перманганатом калия для инактивации микрофлоры, присутствующей на поверхности зерна.

Рекомендуется чистка, мойка и дезинфекция хлорной известью или формалином замочных чанов и солодорастильных аппаратов после освобождения их от солода. В солодовенном цехе необходимо бороться с мицелиальными грибами, которые могут развиваться на солоде. Для борьбы с мицелиальными грибами поверхность стен цеха перед их побелкой следует обрабатывать антисептиком (обычно 2–4 %-м раствором медного купороса).

Варочный цех. После каждой варки внутреннюю поверхность заторных котлов, фильтрационных аппаратов и сушеварочных котлов необходимо тщательно чистить и мыть. Коммуникации необходимо один раз в сутки промывать холодной и горячей водой, затем пропаривать в течение 15–20 мин и вновь промывать холодной водой. Дезинфекция всего этого оборудования обязательна при общей антисептической обработке цеха.

Производственные отходы варочного цеха – пивную и хмелевую дробину – насосом перекачивают в закрытые бункеры. Хранить и транспортировать дробину открытым способом не рекомендуется, так как это создает антисанитарные условия на территории завода.

Необходимо обеспечить надлежащие санитарные условия процесса осветления и охлаждения сусла. Сепараторы для осветления сусла в конце каждой смены необходимо промывать и обрабатывать 2 %-м раствором каустической соды с температурой 7 °С, а затем снова промыть водой. Теплообменники два раза в неделю чистят и дезинфицируют 1 %-м горячим раствором щелочи. Обработку теплообменников, выполненных из нержавеющей стали, проводят еженедельно 1–1,5 %-й азотной кислотой. Дезинфекцию всего варочного цеха проводят обычно антиформалином при общей дезинфекции завода не реже двух раз в месяц.

Дрожжевое отделение. Оно должно быть изолировано и иметь температуру в пределах 2–4 °С. Дрожжевые ванночки и другое оборудование необходимо дезинфицировать 1 %-м раствором хлорной извести

или антиформинном в течение 1–2 ч.

Цех брожения. Этот цех должен быть сухим, в нем необходимо поддерживать температуру на уровне 6–8 °С. Бродильные чаны и танки после перекачивания молодого пива в танки для дображивания очищают механическим способом, моют и обрабатывают дезинфицирующим препаратом в течение 30 мин, после чего смывают водой. Для дезинфекции алюминиевых емкостей щелочные растворы применять запрещается. Универсальным дезинфектантом является четвертичное аммонийное соединение катамин-АБ.

Цех дображивания. Он также должен быть сухим и иметь температуру не выше 3 °С. Для дезинфекции танков применяют те же дезинфектанты, что и в цехе брожения. Тщательно проводят обработку пивопроводов: до начала и после окончания работ их промывают водой и два раза в неделю дезинфицируют антиформинном, каустической содой или катамином-АБ с последующим промыванием водой.

Цех розлива. Все помещения цеха розлива, а также помещения для мойки тары подвергают тщательной санитарной обработке.

Всю систему фильтровально-разливочной установки ежедневно моют, один раз в неделю подвергают механической очистке и дезинфицируют антиформинном или раствором хлорной извести. Разливочные автоматы промывают чистой водой до и после розлива пива. Пивопровод между фильтрационным отделением и разливочными машинами пропаривают один раз в неделю в течение 15 мин.

Розлив пива проводят в отдельных помещениях. Бутылки, бочки и автотермоцистерны перед наполнением тщательно осматривают и моют. Для обработки бутылок в бутылкомоечных машинах применяют 0,5 %-й раствор каустической соды.

Общий санитарно-гигиенический контроль включает и систематическую проверку чистоты воды, а также чистоты рук рабочих на наличие бактерий кишечной группы. Большое внимание обращают на чистоту санитарной одежды, которую хранят в специальных шкафах и регулярно подвергают чистке и дезинфекции.

Продолжение приложения

34. Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль производства дрожжей.

35. Принципиальная технологическая схема производства пива. Очистка и дробление солода и ячменя.

36. Затираание солода. Биохимические процессы, происходящие при затираании.

37. Кипячение сусла с хмелем. Физико-химические процессы при кипячении сусла.

38. Охлаждение и осветление сусла. Физико-химические характеристики процесса.

39. Брожение пивного сусла. Главное брожение и дображивание.

40. Основные процессы при дображивании и созревании пива. Осветление и розлив пива.

41. Характеристика дрожжей, используемых в пивоварении. Микроорганизмы – вредители пивоваренного производства.

42. Санитарно-гигиенический и микробиологический контроль пивоваренного производства.

Продолжение приложения

17. Основная стадия типового биотехнологического процесса – стадия ферментации. Системы аэрации и перемешивания в биореакторах.

18. Теплопередача в процессах ферментации. Системы теплообмена в биореакторах.

19. Выделение и очистка продуктов ферментации (брожения).

20. Получение товарных форм продуктов ферментации.

21. Методы стерилизации жидких сред.

22. Методы иммобилизации ферментов и клеток.

23. Основные биохимические процессы, используемые в пищевых производствах (спиртовое, кисломолочное брожение, гнилостные процессы).

24. Источники посторонних микроорганизмов в пищевых производствах.

25. Дезинфекция в пищевой промышленности.

26. Общие принципы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности.

27. Спиртовое брожение и его практическое использование в пищевых производствах.

28. Превращение азотистых и безазотистых органических веществ в пищевых производствах.

29. Сырье и основные стадии культивирования хлебопекарных дрожжей. Приготовление питательной среды.

30. Влияние условий выращивания хлебопекарных дрожжей на накопление биомассы дрожжей.

31. Технология выращивания посевных хлебопекарных дрожжей.

32. Технология выращивания товарных хлебопекарных дрожжей.

33. Особенности культур дрожжей, используемых для производства прессованных и сушеных хлебопекарных дрожжей. Микроорганизмы – вредители дрожжевого производства.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. Из каких основных стадий состоит производство пива?

2. Назовите основные виды сырья для производства пива. Какова роль солода в процессе получения пивного сусла?

3. Какие способы получения пива используются на современном производстве?

4. Какими свойствами должны обладать культурные дрожжи, используемые в пивоварении?

5. От чего зависит бродительная активность пивных дрожжей?

6. Назовите источники посторонних микроорганизмов в производстве пива.

7. Что такое биологическая стойкость пива? Какие микробы могут вызвать ее снижение?

8. По каким показателям производится микробиологический контроль производственных дрожжей, сусла, молодого пива, готового пива?

9. Каковы санитарно-гигиенические требования к помещениям и оборудованию для хранения ячменя и приготовления солода?

10. Какие мероприятия предусматриваются на производстве для обеспечения санитарно-гигиенического режима в варочном цехе, цехах брожения сусла и дображивания пива?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Домарецкий В.А. Технологія харчових продуктів /Домарецкий В.А, Остапчук М.В., Українець А.І. – К.: НУХТ, 2003
2. Сельскохозяйственная биотехнология. /Под ред. акад. РАСХН Шевелухи В.С. – М.: Высшая школа, 2003
3. Кантере В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. /Кантере В.М. – М.: Агропромиздат, 1990
4. Вербина Н.М. Микробиология пищевых производств. /Вербина Н.М., Каптева Ю.В. – М.: Агропромиздат, 1988
5. Чубанова И.Н. Микробиология /Чубанова И.Н. – М.: Высшая школа, 1987
6. Быков В.А. Расчёт процессов микробиологических производств. /Быков В.А

– К.: Техника, 1985

7. Биотехнология. В 8 кн. /Под ред. Егорова Н.С. – М.: Высшая школа, 1987
8. Промышленная микробиология. /Под ред. Егорова Н.С. – М.: Высшая школа, 1989
9. Остапчук Н.Р. Математическое моделирование процессов пищевых производств. /Остапчук Н.Р. – К.: Техника, 1992
10. Мальцев Г.М. Технология бродильных производств. Мальцев Г.М. – М.: Пищевая промышленность, 1980
11. Панфилов В.А. Научные основы развития технологических линий пищевых производств /Панфилов В.А. – М.: Пищевая промышленность, 1986
12. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию. /Беккер М.Е. – М.: Пищевая промышленность, 1978
13. Виестур У.Е. Биотехнология. /Виестур У.Е., Шмите И.А., Жилевич А.В. – Рига.: Зинатне, 1987
14. Мюллер Г. Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения. /Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г-Д – М.: Пищевая промышленность, 1977
15. Жвирблянская А.Ю., Микробиология в пищевой промышленности /Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. – М.: Пищевая промышленность, 1975
16. Бондар І.В. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія. /Бондар І.В., Гуляев В.М. Дніпродзержинськ: Вид-во ДДТУ, 2004

Продолжение приложения

Вопросы для контрольной работы

1. Промышленная микробиология как научная база бродильных производств. История промышленной микробиологии.
2. Основные сведения о микроорганизмах. Классификация и номенклатура микроорганизмов. Морфологические особенности микроорганизмов .
3. Особенности строения клеток эукариотов.
4. Строение прокариотической клетки. Ультрамикробы.
5. Характеристика основных культур микроорганизмов, применяемых в бродильных производствах – дрожжей и бактерий. Явление спорообразования.
6. Элементарный состав клетки. Функции воды в клетке.
7. Органические компоненты клетки. Строение и функции белков.
8. Строение и функции нуклеиновых кислот, углеводов и липидов.
9. Понятие о ферментах. Особенности ферментативного катализа.
10. Структура, механизм действия и свойства ферментов. Лабильность ферментов.
11. Обмен веществ и питание микроорганизмов. Дыхание клеток.
12. Микроорганизмы и окружающая среда. Влияние биотических (биологических) факторов на микробы.
13. Влияние абиотических (физических и химических) факторов на микроорганизмы.
14. Свойство термоустойчивости клеток. Понятие о стерилизации и пастеризации.
15. Основные стадии типового биотехнологического (бродильного) производства. Приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов .
16. Вторая стадия типового биотехнологического процесса – поддержание чистой культуры микроорганизмов.

Приложение

Задания на выполнение контрольной работы для студентов заочной формы обучения

По дисциплине «Биохимические и микробиологические основы пищевой и бродильной технологии» студенты заочной формы обучения в VIII семестре выполняют контрольную работу. Задание на выполнение этой работы выбирается, как правило, по двум последним цифрам номера зачетной книжки (см. таблицу ниже). Чтобы избежать повторения заданий из года в год, преподаватель имеет право менять способ выбора вопросов для контрольной работы. Ответы на вопросы должны быть краткими, но содержательными и иметь соответствующее теоретическое обоснование. Зачет контрольной работы осуществляется по результатам собеседования преподавателя со студентом после исправления им ошибок и замечаний, выявленных при проверке работы.

Задания для контрольной работы

Шифр задания	Номера вопросов	Шифр задания	Номера вопросов
00	1, 15, 29	15	14, 25, 40
01	2, 16, 30	16	13, 16, 42
02	3, 17, 31	17	12, 17, 37
03	4, 18, 32	18	11, 18, 38
04	5, 19, 33	19	10, 19, 35
05	6, 20, 34	20	9, 20, 36
06	7, 21, 35	21	8, 21, 34
07	8, 22, 36	22	7, 22, 33
08	9, 23, 37	23	6, 24, 32
09	10, 24, 38	24	5, 23, 30
10	11, 25, 39	25	4, 15, 31
11	12, 26, 40	26	3, 27, 41
12	13, 27, 41	27	2, 26, 39
13	14, 28, 42	28	1, 28, 29

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Введение	6
Глава 1. Общие сведения о микроорганизмах	16
1.1 Положение микроорганизмов в системе живого мира. Особенности микроорганизмов	16
1.2 Морфологическая характеристика микроорганизмов	19
1.2.1 Структура эукариотической клетки	19
1.2.2 Строение прокариотической клетки	25
1.2.3 Ультрамикробы	30
1.3 Химический состав клеток микроорганизмов	32
1.3.1 Элементный состав клетки	32
1.3.2 Вода	34
1.3.3 Органические компоненты клетки	35
1.4 Ферменты	41
1.4.1 Природа ферментов и особенности ферментативного катализа	41
1.4.2 Структура, механизм действия и свойства ферментов	44
1.5 Метаболизм микроорганизмов. Общие понятия об обмене веществ и энергии	47
1.6 Взаимосвязь микроорганизмов и окружающей среды	49
1.6.1 Абиотические факторы внешней среды	49
1.6.2 Биотические факторы внешней среды	55
Глава 2. Культивирование микроорганизмов	58
2.1 Общие представления о росте и развитии микроорганизмов	58
2.2 Способы культивирования микроорганизмов	61
2.3 Закономерности роста периодической культуры микроорганизмов	66
2.4 Непрерывное культивирование микроорганизмов	70
2.5 Математическое описание процессов непрерывного культивирования микроорганизмов	73
Глава 3. Основные принципы промышленного осуществления процессов микробного синтеза	78
3.1 Технология приготовления питательных сред для выращивания микроорганизмов	80
3.1.1 Питание микроорганизмов	80
3.2 Стадия поддержания чистой культуры и получения посевного материала	99
3.3 Стадия ферментации	103
3.3.1 Особенности процессов тепломассопереноса в биореакторах	103
3.3.2 Системы перемешивания и аэрации биореакторов	107

3.3.3 Системы теплообмена биореакторов	112
3.4 Стадия выделения и очистки целевых продуктов биосинтеза	116
3.5 Получение товарных форм продуктов микробного синтеза	120
3.6 Понятие об иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов	122
3.6.1 Методы иммобилизации биокатализаторов	124
Глава 4. Специальная микробиология и биохимия пищевых производств	135
4.1 Основные типы биохимических процессов, используемых в пищевых и бродильных производствах	135
4.1.1 Биохимическое превращение органических веществ, не содержащих азот (безазотистых веществ)	135
4.1.2 Биохимическое превращение органических веществ, содержащих азот	142
4.2 Основы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности	145
4.2.1 Источники посторонних микроорганизмов в пищевых производствах	145
4.2.2 Патогенная микрофлора. Санитарно-показательные микроорганизмы	151
4.2.3 Общие принципы микробиологического и санитарно-гигиенического контроля в пищевой промышленности.	153
4.3 Дезинфекция в пищевой промышленности	157
Глава 5. Микробиологические и биохимические основы технологии производства микробной биомассы	162
5.1 Микробиология и биохимия дрожжевого производства	162
5.1.1 История использования микроорганизмов для получения пищевого белка	162
5.1.2 Основные стадии технологического процесса	164
5.1.3 Особенности культур дрожжей, используемых в производстве	168
5.1.4 Микроорганизмы – вредители дрожжевого производства	169
5.2 Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль дрожжевого производства	173
5.2.1 Микробиологический контроль производства дрожжей	173
5.2.2 Санитарно-гигиенический режим производства дрожжей	176
Глава 6. Микробиологические и биохимические основы технологии получения продуктов брожения	179
6.1 Микробиология и биохимия пивоваренного производства	179
6.1.1 Сырье и основные стадии технологического	

процесса	179
6.1.2 Характеристика производственных дрожжей	182
6.1.3 Микроорганизмы – вредители пивоваренного производства	185
6.2 Микробиологический и санитарно-гигиенический контроль пивоваренного производства	190
6.2.1 Микробиологический контроль производства пива	190
6.2.2 Санитарно-гигиенический режим пивоваренного производства.	192
Список литературы	195
Приложение. Задания на выполнение контрольной работы для студентов заочной формы обучения	200